

SÉRIE A, N° 4256

N° D'ORDRE :

5107

THÈSES
PRÉSENTÉES A LA
FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marie-Joséphé, Dominique LABIE

1^{re} THÈSE :

“ Une nouvelle Hémoglobine normale,
l'Hémoglobine A₄ ”

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté

Soutenues le

, devant la Commission d'Examen :

MM. TONNELAT, *Président*.

CHAPEVILLE

DUBERT

} *Examineurs.*

IMPRIMERIE LANORD
22, rue Chauvelot, Paris-15^e

1964

SÉRIE A, N° 4256

N° D'ORDRE :

5107

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marie-Joséphé, Dominique LABIE

1^{re} THÈSE :

“ Une nouvelle Hémoglobine normale,
l'Hémoglobine A_4 ”

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté

Soutenues le _____, devant la Commission d'Examen :

MM. TONNELAT, *Président*.

CHAPEVILLE }
DUBERT } *Examineurs.*

IMPRIMERIE LANORD
22, rue Chauvelot, Paris-15^e

—
1964



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen	M. ZAMANSKY
G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparée.
GRASSE	T Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T Chimie organique.
WYART	T Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T Zoologie.
MANGENOT	T Biologie végétale (ORSAY).
AUGER	T Physique quantique et relativité.
MONNIER	T Physiologie générale.
PIVETEAU	T Paléontologie.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).
CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T Chimie générale.
FAVARD	T Géométrie supérieure.
COULOMB	T Physique du globe.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRETIEN	T Chimie minérale.
DRACH	T Zoologie.
KASTLER	T Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T Génétique.
RIVIERE	T Géologie (S.P.C.N.) et Sédimentation (ORSAY).
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).
R. LUCAS	T Recherches physiques.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.
ARNULF	T Optique appliquée.
MORAND	T Physique enseignement.
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.).
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.
PETIT	T Biologie maritime.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T Embryologie.
EICHHORN	T Botanique.
DE CUGNAC	T Biologie végétale (S.P.C.N.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.
THELLIER	T Physique du globe.
L'HERITIER	T Biologie générale (ORSAY).
GRIVET	T Radioélectricité (ORSAY).
PONCIN	T Mécanique générale.
DUBREIL	T Arithmétique et Théorie des nombres.
QUELET	T Chimie organique.
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T Micropaléontologie.
JUNG	T Géologie.
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (ORSAY).
VASSY	T Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T Théories physiques.
AMIEL	T Chimie générale.
HOCART	T Minéralogie et Cristallographie.
J.-P. MATHIEU	T Physique optique.
COUTEAUX	T Cytologie.
MAY	T Zoologie (ORSAY).
CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T Biologie végétale marine.
GUINIER	T Physique des solides (ORSAY).
JOST	T Physiologie comparée.
FORTET	T Calcul des probabilités et Physique mathém.
SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.

CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techni. Aéron.).
ERELOT	T	Calcul différentiel et intégral.
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUE	T	Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée.
MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
M ^{lle} LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition.
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANCON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie.
GODEMENT	T	Mathématiques (M.G.P.).
PISOT	T	Technique mathématique de la physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (ORSAY).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
M ^{me} TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LEVY	T	Physique théor. des hautes énergie (ORSAY).
M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
M ^{me} HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.).
BRUN	T	Mécanique théorique des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique (ORSAY).
M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques (Agrég.).
M ^{me} LELONG	T	Mathématiques II (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
J.-E. DUBOIS	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
CASTANG	T	Chimie minérale (ORSAY).
CURIEN	T	Energétique générale.
A. MICHEL	T	Electricité (ORSAY).
OLMER	T	Mécanique appliquée.
ROUAULT	T	Chimie physique.
GAUTHIER	T	Physique atomique.
BARCHEWITZ	T	Physiologie comparée.
BROSSEL	T	Physiologie végétale (ORSAY).
BUSER	T	Physique II Thermo nucléaire (ORSAY).
CAMUS	T	Minéralogie et cristallographie.
MOYSE	T	Physiologie végétale (ORSAY).
NOIROT	T	Evolution des êtres organisés.
PANNETIER	T	Chimie générale.
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie quantique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radioactivité (ORSAY).
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique (ORSAY).
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (ORSAY).

FREYMANN	T	Recherches Physiques.
GUINOCHET	T	Biologie végétale (S.P.C.N. - ORSAY).
ROLLET	T	Chimie minérale.
M ^{lle} JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (ORSAY).
CHAPELLE	T	Physique I (ORSAY).
DELANGE	T	Mathématiques I (ORSAY).
DENY	T	Mathématiques générales (ORSAY).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
G. LUCAS	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique des particules fondament. (ORSAY).
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
M ^{me} ALBE-FESSARD	T	Psycho-physiologie.
FRIEDEL	T	Physique des solides (ORSAY).
M. JULIA	T	Etudes des moléculaires complexes.
LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N. - ORSAY).
MAGAT	T	Physico-chimie des radioéléments.
M ^{lle} QUINTIN	T	Electrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiologie animale (ORSAY).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
LEMEE	T	Ecologie végétale (ORSAY).
GUERIN	T	Chimie (M.P.C. - ORSAY).
M. CHATELET	T	Chimie (P.C.B.).
JEAN	T	Physique nucléaire (ORSAY).
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.).
BERGERARD	T	Zoologie (ORSAY).
BERTEIN	T	Electronique (ORSAY).
BOUSSIÈRES	T	Radiochimie.
M ^{me} COUTURE	T	Thermonucléaire et Mécanique physique.
ELLENBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe.
FRANC	T	Biologie animale (P.C.B.).
SCHNELL		Botanique tropicale.
STOLKOWSKI	T	Physiologie végétale.
ACHER	T	Chimie biologique.
BAUDOIN		Biologie animale (P.C.B.).
BEAUMONT		Biologie animale (S.P.C.N.).
BLAMONT	T	Géophysique-ionosphère.
BOURREAU	T	Botanique.
D. CURIE		Physique (M.G.P.).
DURAND-DELGA	T	Géologie.
FREON	T	Chimie organique (ORSAY).
HELLER	T	Physiologie végétale.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T	Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.).
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
M ^{lle} FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
M ^{me} CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mécan. céleste.
M ^{lle} VEIL	T	Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNK	T	Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (ORSAY).
BROCHARD	T	Physique (P.C.B. - ORSAY).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques I (ORSAY).
MAZET	T	Mécanique générale (ORSAY).
CAIRE		Géographie physique et Géologie dynamique.
COMOLET	T	Mécanique des fluides.
CORABCEUF	T	Physiologie animale (ORSAY).

DELLOUE	Physique de l'exosphère.
GORENFLOT	Botanique II (ORSAY).
HOUILLOIN	Biologie animale (P.C.B.).
J. JULLIEN	Chimie (S.P.C.N. - ORSAY).
MALGRANGE	T Technique mathémat. de la phys. (ORSAY).
OLIVIER	Antropologie.
NOZERAN	T Botanique II (ORSAY).
BLANC-LAPIERRE	T Physique (E.N.S. - ORSAY).
CHEVAUGEON	T Botanique (ORSAY).
KAHANE	T Mathématiques (ORSAY).
SAMUEL	T Mathématiques (E.N.S. féminines).
KOURGANOFF	T Astronomie (ORSAY).
THIRY	T Mécanique céleste.
ABELES	Physique (S.P.C.N.).
AMAT	T Physique (P.C.B.).
AUBOIN	T Géologie.
M ^{me} BENOIT-GUEUTAL	T Physique nucléaire et radioactivité (ORSAY).
BOUGIS	Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
BRUHAT	T Mathématiques (M.P.C.).
BRUNN	T Géologie historique (ORSAY).
CHABBAL	T Physique (M.G.P. - ORSAY).
DEHEUVELS	T Mathématique propédeutique.
D'ESPAGNAT	T Physique théorique (ORSAY).
FURON	T Géologie (S.P.C.N.).
M ^{me} GANS	T Génétique.
GENEVES	Biologie végétale (P.C.B.).
GUILBERT	Physique (C.U.S. - ORLEANS).
HUPE	T Pétrographie.
HOLLANDE	T Biologie générale.
LIONS	T Analyse numérique.
MAITTE	T Chimie (P.C.B.).
MEYER	Physique propédeutique.
NICOLAS	Géologie appliquée.
PANIGEL	Biologie générale.
RAVIER	Pétrographie.
ROSEAU	T Mécanique théorique des fluides.
ROUBINE	T Electronique.
SILBER	T Chimie (P.C.B.).
UEBERSFELD	T Electronique.
YVON	T Théories physiques.
HERVE	T Mathématiques.
NERON	T Mathématiques (M.P.C. - ORSAY).
M ^{me} PECKER-WIMEL	T Astrophysique.
BALKANSKY	Physique (M.P.C.).
LE CORRE	T Electricité.
DELCROIX	T Physique théorique (ORSAY).
GOURDIN	Physique théor. des Hautes Energies (ORSAY).
LEHMANN	T Physique Exp. des Hautes Energies (ORSAY).
NATAF	T Physique nucléaire et radioactivité (ORSAY).
ECHALIER	Biologie animale (P.C.B.).
BARRAUD	Physiologie cellulaire.
LIORÉ	Physiologie végétale (ORSAY).
DARS	Géologie structurale et géologie appliquée.
CAMEFORT	T Botanique (agrégation).
VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle.
BLAQUIERE	Electronique (ORSAY).
ARNOUS	T Physique théorique.
TATIBOUET	Chimie (C.U.S. - ORLEANS).
MALLIAVIN	T Mathématique propédeutique (ORSAY).
GAUDEMAR	Chimie propédeutique.
PEREZ Y JORBA	Physique Exp. des Hautes Energies (ORSAY).
DAVID	T Chimie (Agrégation - ORSAY).
BROUSSE	T Mécanique théorique.

Secrétaire général

R. POUILLAIN

A MES PARENTS

A MES FRÈRES ET SŒURS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ROBERT DEBRÉ,
en témoignage de mon profond respect;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GEORGES SCHAPIRA,
qui, nous ayant accueillis dans son Laboratoire, n'a cessé de nous
faire bénéficier de ses conseils et de son amitié, en témoignage
de notre gratitude et de notre attachement;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-CLAUDE DREYFUS;

A MONSIEUR JACQUES KRUH,
Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de Paris,
leur aide et leurs conseils nous ont souvent été précieux;

A MONSIEUR JEAN ROSA,
Maître de Conférences à l'Ecole de Médecine de Rouen,
dont j'ai apprécié l'amicale collaboration;

A TOUS NOS AMIS DU LABORATOIRE,
à qui ce travail doit beaucoup;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES TONNELAT;

A MONSIEUR FRANÇOIS CHAPEVILLE;

A MONSIEUR JEAN-MARIE DUBERT,
Maîtres de Conférences à la Faculté des Sciences de Paris,
qui ont accepté de constituer notre Jury de thèse, en témoignage
de reconnaissance.

INTRODUCTION

L'hémoglobine a souvent constitué un modèle d'étude de l'hétérogénéité d'une protéine. Celle-ci, en effet, est facile à préparer à l'état de pureté et en grande quantité; son importance et son rôle physiologique justifient l'intérêt qui lui a été porté. Sa structure chimique est aujourd'hui connue, les voies de son métabolisme établies.

On a mis en évidence il y a quelques années l'existence de plusieurs hémoglobines génétiquement différentes chez un même individu : hémoglobine fœtale et hémoglobine adulte (KÖRBER 1866) (46), (BRINKMAN et JONKIS 1935) (12) (45), hémoglobine anormale et hémoglobine normale (PAULING, ITANO, SINGER et WELLS 1949) (72).

Chez un certain nombre d'animaux par ailleurs (cheval, canard, souris) on a reconnu l'existence simultanée de plusieurs hémoglobines qui sont également des entités génétiques (BANGHAM et LEHMANN), (5).

Mais, indépendamment de la connaissance de ces hémoglobines, dont le caractère génétiquement différent a été démontré, différents moyens d'analyse anciens avaient permis d'établir l'hétérogénéité de l'hémoglobine adulte normale elle-même. Cette hétérogénéité a été authentifiée par l'emploi des isotopes radioactifs (SCHAPIRA, DREYFUS et KRUB) (82).

Cependant, les moyens de fractionnement employés, s'ils permettaient d'affirmer cette hétérogénéité, ne réalisaient pas un isolement suffisamment bien défini des fractions hétérogènes pour en permettre une interprétation métabolique ou génétique.

Une nouvelle étape s'est ouverte avec l'amélioration des moyens de fractionnement : essentiellement électrophorèse sur bloc d'amidon (KUNKEL, 1953) (50) et chromatographie sur résine échangeuse d'ions (HUISMAN et PRINS, 1955) (36), MORRISON et COOK, 1955) (67), SCHROEDER et coll., 1958, 1959, 1960) (2) (15) (88).

Ces deux groupes de méthodes permettent d'isoler, à côté d'un constituant principal, des constituants hémoglobiniques mineurs. Le fractionnement repose sur des critères physico-chimiques beaucoup mieux définis que les fractionnements anciens.

L'interprétation de la signification de ces constituants mineurs a donné lieu à de nombreux travaux. En effet, l'existence d'une fraction mineure peut s'interpréter de deux façons différentes :

1) Comme l'hémoglobine fœtale ou les hémoglobines anormales, la fraction mineure constitue une protéine indépendante du constituant

principal. Sa synthèse est génétiquement déterminée. C'est ainsi que la fraction A_2 , (KUNKEL et WALLENIUS 1955) (53), est liée à une variation qui s'est produite sur la chaîne polypeptidique au cours de l'évolution. Sa synthèse, chez l'homme, est contemporaine de celle de l'hémoglobine A_1 . (INGRAM et STRETTON), (42).

2) La fraction mineure constitue une étape dans la « vie » de l'hémoglobine principale. C'est ainsi que la fraction A_3 , décrite également par KUNKEL et WALLENIUS (1955) (53), est étudiée plus récemment par MULLER (1961) et ROSA (Thèse de Sciences en cours), est liée à un « vieillissement » de l'hémoglobine qui fixe progressivement du glutathion au cours de la vie du globule rouge.

Dans ce travail, nous mettons en évidence une nouvelle fraction hémoglobinique qui se différencie de l'hémoglobine principale à la fois par son comportement sur la colonne de résine échangeuse d'ions et par la cinétique de l'incorporation des précurseurs marqués aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ayant isolé et décrit cette fraction, nous aurons à discuter la signification métabolique de cette hémoglobine et les problèmes génétiques qu'elle soulève.

CHAPITRE I

TRAVAUX ANTÉRIEURS

De nombreux travaux, depuis plus de vingt ans, ont cherché à définir quels étaient les critères de pureté d'une protéine, et à établir des techniques de fractionnement d'un mélange hétérogène. Ces recherches se sont heurtées au double écueil de techniques insuffisamment résolutives pour déceler une hétérogénéité, de techniques faussement résolutives créant des pseudo-hétérogénéités.

L'hémoglobine, protéine apparemment facile à isoler et à purifier, dont le rôle physiologique important justifie l'intérêt qu'on lui a porté, a depuis longtemps été particulièrement étudiée.

Parmi ces études anciennes certaines sont restées valables, telle l'étude de la résistance à la dénaturation alcaline (13) (14) (91) (77) qui a permis d'établir la différence entre l'hémoglobine adulte et l'hémoglobine fœtale.

Les fractionnements par relargage dans les solutions de force ionique croissante (79) ont montré l'existence d'au moins deux hémoglobines différentes chez un même animal adulte.

L'interprétation de la mobilité électrophorétique ou de la constante de sédimentation en milieu acide doit être révisée puisqu'on connaît actuellement la dissociation de l'hémoglobine dans ces conditions (24) (43) (92).

Nous signalerons enfin parmi les techniques d'étude anciennes le pouvoir moussant, la vitesse d'étalement en couche mince, la capacité spécifique de fixation d'oxygène et les méthodes immunochimiques. Toutes ces méthodes sont cependant dans leur ensemble entachées d'incertitude. Rien ne prouve en effet que le processus d'analyse lui-même n'ait pas modifié la protéine et décelé une hétérogénéité qui n'est en réalité qu'un artefact. Une partie de l'hémoglobine peut aussi être associée à un autre composé, réalisant ainsi une hétérogénéité apparente. Il est impossible d'affirmer que l'hétérogénéité préexistait à l'analyse.

HÉTÉROGÉNÉITÉ MÉTABOLIQUE

Cette technique décrite pour la première fois en 1950 par SCHAPIRA, DREYFUS et KRUH (82) a permis de démontrer l'authenticité de l'hétérogénéité par l'emploi des isotopes radioactifs incorporés dans la molécule au cours d'un processus de biosynthèse.

Principe

Si on marque *in vivo* un animal par un précurseur radioactif de l'hémoglobine, ^{59}Fe ou acide animé marqué au ^{14}C , et qu'on fractionne ultérieurement l'hémoglobine de cet animal, l'inégalité des activités spécifiques des produits de fractionnements témoigne d'une hétérogénéité préexistante au fractionnement, donc d'une différence dans leur métabolisme. Leur égalité, par contre, n'est qu'un argument de présomption en faveur de l'homogénéité de la protéine.

Applications

Cette méthode a été appliquée à différentes techniques de fractionnement qui sont exposées par KRUH (47) : le fractionnement par dénaturation alcaline ménagée, par absorption sur alumine, par électrophorèse, par chromatographie sur papier. Les deux premiers modes de fractionnement ont été appliqués après biosynthèse *in vitro* des hémoglobines.

Résultats

L'ensemble des résultats (84) (85) (86) permet de conclure à l'existence, chez l'animal adulte, d'au moins deux hémoglobines différant par leurs caractères physico-chimiques, et dont la différence d'activité spécifique est significative. Mais tout en permettant d'affirmer à la fois une hétérogénéité et son caractère métabolique, ils n'avaient cependant pas permis d'en interpréter les significations chimique et biologique.

ELECTROPHORÈSE SUR BLOC D'AMIDON

Une seconde étape importante a été franchie avec l'amélioration des techniques de fractionnement. En 1955, KUNKEL et WALLENIUS décrivaient la migration électrophorétique de l'hémoglobine sur bloc d'amidon (53). À côté d'une fraction principale migrant vers l'anode à pH alcalin et représentant 90 % de l'hémoglobine, ils isolaient une fraction mineure plus rapide représentant 10 % du total et ne se séparant pas complètement de la fraction principale. Ces deux fractions isolées et soumises à une nouvelle électrophorèse avaient cette fois une migration homogène, différant l'une de l'autre.

Un certain nombre de travaux ont montré que cette fraction augmentait au cours du vieillissement du globule rouge (KUNKEL et BEARN) (51), (BANNEY et KONO) (78), (MEYERLING et HUISMAN) (61), (ROSA et SCHAPIRA) (81), (87).

La méthode de l'hétérogénéité métabolique a permis d'étudier l'évolution de l'activité spécifique chez deux fractions en fonction du temps écoulé après une injection d'isotope radioactif et montré que la fraction mineure se forme aux dépens de la fraction moyenne au cours du vieillissement du globule rouge (61) (62). Le fractionnement des globules rouges selon leur âge a montré l'augmentation de cette fraction chez

les globules rouges vieilliss. Enfin MULLER d'une part (70), ROSA par ailleurs (81) ont pu montrer que cette modification du comportement électrophorétique de l'hémoglobine est liée à une fixation de glutathion. ROSA a montré qu'il s'agit là d'un phénomène continu et constant au cours de la vie du globule rouge.

CHROMOTOGRAPHIE SUR ÉCHANGEURS D'IONS

Parallèlement à l'électrophorèse sur bloc d'amidon une autre série de travaux permettait également des fractionnements d'hémoglobine sur résines échangeuses d'ions. Là encore, les critères physico-chimiques étaient bien définis.

Les fractionnements sur colonne d'alumine réalisés par KRUH (47) se rapprochent de ces techniques. En 1955, BOARDMAN et PARTRIDGE séparaient l'hémoglobine foetale de l'hémoglobine adulte sur Amberlite IRC 50 (8).

À la même époque HUISMAN et PRINS séparaient également sur Amberlite IRC 50, les différentes hémoglobines anormales en utilisant un tampon citrate et un gradient discontinu en Na^+ (36) (76). Et MORRISON et COOK séparaient l'hémoglobine adulte normale en trois fractions différentes en utilisant un tampon citrate-phosphate avec un gradient de Na^+ (67). D'autres chercheurs essayèrent de reproduire cette expérience. Ils retrouvèrent, outre une fraction principale, une fraction mineure rapide, mais ne purent retrouver la fraction mineure lente. Depuis ce moment il y a eu essentiellement deux séries de travaux.

L'une est représentée par la publication de HUISMAN, MARTIN et DOZY (34) et de GUTTER, PETERSON et SOBER (29), puis les publications ultérieures de HUISMAN et coll. (35) (61) (62). Les fractionnements d'hémoglobine de ces auteurs ont été dans certains cas faits sur Amberlite IRC 50, mais le plus souvent ils ont opéré sur carboxy méthycellulose, à molarité constante en Na^+ , mais avec un gradient de pH suivant le dispositif décrit par PETERSON et SOBER (73). Les résultats sont dans l'ensemble à rapprocher de ceux qu'obtiendrait l'électrophorèse de zone, quoique plus raffinés, ou de ceux qu'avaient décrits MORRISON et COOK (67).

Une autre série d'expériences emploie une technique un peu différente. C'est celle qui a été décrite par ALLEN, SCHROEDER et BALOG (2) avec les modifications ultérieures qu'y ont apporté SCHROEDER et coll. (15) (88).

Leurs fractionnements sont obtenus en chromatographie d'équilibre, à concentration saline et à pH constants en présence de KCN. Les résultats en sont sans doute moins bons que ceux de la méthode précédente quand il s'agit d'isoler plusieurs hémoglobines de charge nettement différente. Mais cette méthode permet dans des conditions rigoureuses de concentration saline et de pH, à déterminer pour chaque hémoglobine, la séparation de nombreux constituants mineurs.

On a comparé les résultats obtenus par ces différentes méthodes d'électrophorèse et de chromatographie. Nous signalerons les travaux de GRATZER et de BAEVEN (26), de SCHNECK et SCHROEDER (89), de KUNKEL et coll. (52), de LAURENT et coll. (56), de MEYERING et de HUISMAN (61),

quoique dans ce dernier cas le mode de fractionnement sur Amberlite IRC 50 soit encore particulier et non comparable sans doute à celui de SCHROEDER et coll. En fait, les fractions obtenues par ces différentes méthodes sont rarement pures dès le premier fractionnement, et l'équivalence n'est pas absolue entre les fractions ainsi isolées.

Nous avons choisi pour notre part la méthode des chromatographies d'équilibre en tampon phosphate et en présence de KCN selon la technique décrite par SCHROEDER et coll. Elle nous a permis l'isolement d'une fraction non encore décrite par ces auteurs.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES EMPLOYÉES

I. - MATÉRIEL

Des lapins de 2 à 4 kg ont été marqués *in vivo* par injection de ^{59}Fe par voie intramusculaire, 20 microcuries par kilog dans 3 à 10 microgrammes de fer. Les prélèvements ont été faits à la veine marginale de l'oreille à des intervalles compris entre la 16^e heure et le 38^e jour après l'injection. Ils n'ont en général pas dépassé 10 à 15 ml quand le même lapin devait subir plusieurs prélèvements, afin de ne pas troubler l'hématopoïèse.

Certains lapins ont été rendus réticulocytaires par cinq injections intramusculaires quotidiennes de chlorhydrate de phenylhydrazine neutralisé, à la dose de 0,4 ml/kg d'une solution à 2 % (8 mg par kg de poids).

Des échantillons d'hémoglobine humaine ont été recueillis, la plupart chez des sujets ayant reçu deux à quatre jours avant le prélèvement 20 microcuries de ^{59}Fe dans un but diagnostic, un autre chez un enfant présentant une réticulocytose de 30 %.

Tous les prélèvements ont été faits sur héparine (0,1 ml pour 10 ml de sang).

II. - MÉTHODES

PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'HÉMOGLOBINE

Les solutions d'hémoglobine de lapin ont été préparées par relargage en solutions de phosphates, selon la méthode décrite par ROCHE, DERRIEN et MOUTTE (79). Après lavage et hémolyse des globules rouges par deux volumes d'eau distillée, on ajoute la solution équimoléculaire de phosphates mono et bipotassique 3,5 M, jusqu'à une concentration finale de 2,8 M afin de précipiter les protéines autres que l'hémoglobine. Le filtrat clair d'hémoglobine est alors lui-même précipité en amenant la solution à la concentration de 3,5 M en phosphates. Le précipité est repris par un minimum d'eau et dialysé sous pression contre de l'eau renouvelée plusieurs fois.

Les échantillons, une fois préparés, sont toujours conservés à l'obscurité et à 0°. Toutes les hémoglobines, amenées à la concentration voulue, sont ensuite dialysées 16 heures contre 100 fois leur volume du tampon utilisé pour la chromatographie, puis centrifugées 30 minutes à 20.000 g.

La concentration des solutions d'hémoglobine est déterminée au spectrophotomètre à 540 et 544 m μ sous forme de cyanmethémoglobine en vérifiant que l'absorption est bien la même sur les deux longueurs d'onde.

Les deux échantillons d'hémoglobine humaine ont été préparés par purification au toluène, selon la méthode de DRABKIN (18). Les globules rouges, séparés du plasma par centrifugation, sont lavés quatre fois par une solution isotonique puis légèrement hypertonique de chlorure de sodium. Ils sont hémolysés à froid par 1,5 fois leur volume d'eau distillée et 0,4 fois leur volume de toluène. On agite vigoureusement et on laisse une nuit à 4°. Le lendemain, l'hémolysat clair est séparé par centrifugation des stromas plus lourds, des débris lipidiques et du toluène plus légers. Cet hémolysat est ensuite recentrifugé une heure à 15.000 g. Avant la chromatographie, il est dosé, puis dialysé comme l'hémoglobine de lapin.

CHROMATOGRAPHIE SUR AMBERLITE IRC 50

Nous avons employé la méthode des chromatographies d'équilibre de SCHROEDER et coll. (2) (15) (88) modifiée.

a) *Préparation des colonnes.*

La résine polycarboxylique échangeuse de cations (Amberlite IRC 50) a été purifiée par passages successifs sous la forme sel de sodium et sous la forme acide selon la méthode de HIRS, MOORE et STEIN (31). Les résines sont soigneusement tamisées, et toutes les chromatographies sont faites avec le lot compris entre 250 et 325 mailles (MESH). La résine sous forme acide et soigneusement lavée est mise en suspension et agitée dans le tampon de la chromatographie. Le pH de cette suspension s'abaisse alors fortement. Tout en continuant l'agitation, on ramène ce pH à celui du tampon par addition de soude (hydroxide de Na à 40 %) à intervalles réguliers. Quand ce pH est atteint, on continue l'agitation plusieurs heures. La résine est alors lavée sur un entonnoir de verre fritté avec le tampon jusqu'à ce que le pH de ce tampon soit identique avant et après passage sur la résine.

La résine est alors suspendue dans 2 à 3 fois son volume de tampon et versée à l'état de suspension homogène dans les colonnes. Les colonnes utilisées avaient un (1) cm de diamètre et 50 cm de hauteur (hauteur de la résine : 35 cm). La résine est sédimentée par portions successives selon la technique de MOORE et STEIN (63) par simple gravité, sans pression, en siphonnant chaque fois ce qui n'a pas sédimenté en 15 minutes pour éviter le dépôt de grains trop fins qui colmatent la colonne. Cette sédimentation est faite à la température du laboratoire. La colonne est ensuite équilibrée par passage de tampon pendant plusieurs jours d'abord à la température du laboratoire, puis à 4-6° pendant 2 à 3 jours avant la chromatographie.

Entre deux chromatographies, la colonne est régénérée par passage de 1.000 ml du tampon dans les mêmes conditions.

Le tampon utilisé a été le tampon n° 1 de ALLEN et SCHROEDER (2) :

phosphate monosodique 0,025 M ($\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

phosphate disodique 0,025 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

pH $7,18 \pm 0,02$, Na^+ 0,075 M, KCN 0,01 M.

Nous avons toujours opéré en présence de cyanure de potassium pour éviter les artefacts de chromatographie dus à une différence dans le niveau d'oxydation des hémoglobines.

La cyanmethémoglobine formée a en effet le même comportement chromatographique que l'oxyhémoglobine, alors que la méthémoglobine a un comportement différent.

b) *Techniques de chromatographie.*

On remet en suspension dans le tampon les 2 ou 3 cm supérieurs de la colonne et on les laisse sédimenter pour assurer l'horizontalité de la surface. On laisse écouler le liquide surnageant jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un ménisque à la surface. La solution d'hémoglobine (60 mg dans 3 ml), préalablement dialysée et centrifugée, est déposée très doucement à l'aide d'une pipette à bout courbe contre la paroi de la colonne, au niveau du ménisque. Avant que cette solution ne soit adsorbée par la résine, on dépose juste au-dessus, contre la paroi de la colonne, le tampon d'élution. Les différences de densité empêchent le mélange des deux zones. A ce moment seulement est commencée l'adsorption de l'échantillon et l'élution chromatographique, dont la vitesse est réglée à 6 ml par heure. Nous recueillons une fraction toutes les trente minutes. La vitesse d'écoulement est réglée par la pression hydrostatique exercée par le niveau du récipient d'alimentation.

La plus grande partie de l'hémoglobine adsorbée s'élue à cette température et à cette vitesse. La fin de l'élution cependant doit se faire après réchauffement de la colonne à une température constante, habituellement 28° . Au moment du réchauffement, l'élution est interrompue pendant 30 minutes. Quand on laisse de nouveau s'écouler la colonne, le débit s'accélère spontanément, et toute l'hémoglobine adsorbée est recueillie en quelques tubes, correspondant au volume de rétention de la colonne.

MÉTHODE DE DOSAGE DES FRACTIONS D'HÉMOGLOBINE

Tous les dosages ont été faits avec un spectrophotomètre Beckmann D.U. Les fractions sont lues directement, sans dilution préalable, à 420 m μ ou à 553 m μ . Ces deux longueurs d'onde correspondent aux points isobétiques du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la cyanmethémoglobine. Nous avons vérifié que ces lectures étaient constantes d'un jour à l'autre. La lecture à 553 m μ évite la dilution des fractions concentrées. Le rapport des densités optiques à 420 m μ et à 553 m μ est une constante stable (9,5).

Dans certains cas, les dosages ont été faits après transformation complète en cyanmethémoglobine, sur 540 et 544 m μ (16) (17).

MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation à cristal d'iodure de sodium. Dans des tubes calibrés nous avons mesuré la radioactivité de 2 ml de chaque fraction.

L'activité spécifique de chaque fraction est égale au rapport

$$\frac{\text{Radioactivité dans 2 ml (en coups/minute)}}{\text{Densité optique à 553 m}\mu}.$$

CONTROLE DE LA VALEUR DES TECHNIQUES

a) *Préparation des hémoglobines par ultracentrifugation.*

Certains échantillons ont été préparés simultanément par relargage en phosphate 3,5 M et par ultracentrifugation à 105.000 g pendant 60 minutes. Des chromatographies ont été effectuées à partir des deux échantillons. Les activités spécifiques se sont révélées identiques.

b) *Purification par électrophorèse sur bloc d'amidon avant la chromatographie.*

Cette électrophorèse a été faite dans un grand nombre de cas, après préparation de la solution d'hémoglobine et avant la chromatographie, dans le but d'éliminer une éventuelle protéine de contamination. Nous avons utilisé une technique adaptée de celle de KUNDEL (50) et décrite par ROSA (80). Les plaques utilisées mesuraient 450 × 330 × 3 mm. Le tampon utilisé était un tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,05 avec lequel l'amidon est lavé à trois reprises à 45°.

L'hémoglobine est utilisée en solution à 10 %, chaque plaque permettant la migration d'un ml, soit 100 mg d'hémoglobine. Les électrophorèses sont appliquées en chambre froide sous une différence de potentiel de 500 volts à la source pendant 16 heures, soit 6 à 7 volts/cm avec une intensité de 30 m Amp.

Après l'électrophorèse, la totalité de l'hémoglobine, à l'exception de celle qui n'a pas migré, est prélevée et éluée sur Buchner par une solution saline. Les éluats sont concentrés par dialyse sous vide, selon la technique décrite par HUEHNS et SHOOTER (32) contre le tampon qui servira à la chromatographie.

PRÉPARATION DE LA GLOBINE ET DE L'HÉMINE

La séparation de l'hème et de la globine se fait par précipitation de cette dernière par l'acide chlorhydrique à 1 % dans l'acétone, selon la technique d'ANSON et MIRSKY (3).

La globine est alors lavée à l'acétone chlorhydrique, puis à l'acétone et à l'éther, et séchée.

La solution acétonique d'hémine est concentrée par évaporation. L'hème est alors précipité par addition d'eau, lavé plusieurs fois à l'eau, puis séché à l'étuve et repris sous forme d'hémochromogène par la pyridine.

PRÉPARATION DE L'HÉMINE CRISTALLISÉE

La cristallisation de l'hémine, quand la globine n'avait pas à être préparée simultanément, a été effectuée selon la technique de LABBE et NISHIDA (54). La globine est précipitée par l'acide acétique dans l'acétone en présence de chlorure de strontium. Le filtrat est alors chauffé à 100° pour obtenir la cristallisation de l'hémine et les cristaux lavés par l'acide acétique à 50 %, puis l'alcool éthylique et l'éther.

ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AMIDON

Elles ont été faites dans différents tampons et différents pH :

- tampon borate de pH 8,6 selon la description initiale de SMITHIES (93) (94),
- tampon discontinu tris borate pH 8,6, selon la méthode de POULIK (74),
- tampon discontinu tris citrate-borate pH 9,5, selon la technique décrite par HAUT, TUDHOPE, CARTWRIGHT et WINTROBE (30),
- tampon phosphate de sodium de pH 6,5 en utilisant la technique décrite par FESSAS (23),
- tampon phosphate de sodium pH 7,4, selon la technique décrite par GAMMACK, HUEHNS et SHOOTER (25).

Les colorations ont été faites à l'amido-schwartz (93) et à la benzidine (64).

HYBRIDATIONS INTERSPÉCIFIQUES

Pour étudier la dissociation et réassociation des chaînes des hémoglobines, nous avons appliqué la technique de dialyse contre un tampon acide, inspirée de celle décrite par ITANO et SINGER (43) (92) et par VINOGRAD et HUTCHINSON (97). Les hémoglobines susceptibles de s'hybrider sont amenées à une même concentration de 2 %. Mais notre mélange est fait avec un volume double de l'une des deux hémoglobines pour favoriser la formation d'hybrides (55). Le mélange est dialysé 24 heures contre un tampon acétate 0,1 M de pH 4,7, contenant 0,01 M de KCN, puis de nouveau 24 heures contre un tampon de neutralisation. Le contrôle a été fait par électrophorèse en gel d'amidon, réalisé en utilisant le système discontinu tris-borate décrit par POULIK (74) et le tampon phosphate 0,053 M décrit par GAMMACK, HUEHNS et SHOOTER (25).

TECHNIQUE DES « FINGERPRINTS »

Les électrophorèses-chromatographies ont été faites après hydrolyses trypsiques et chymotrypsiques selon une technique dérivée de la technique initiale d'INGRAM (37) modifiée par BAGLIONI (6).

Les solutions d'hémoglobine sont débarrassées de leurs sels par dialyse répétée contre de l'eau, ajustées à pH 8 par NaOH N/100. L'hémoglobine est alors dénaturée par la chaleur à 90 ° pendant 4 minutes. L'hydrolyse est faite en présence de bicarbonate d'ammonium à 1 %, à 37° et sous azote avec une agitation constante, par 1,5 mg de trypsine (purifiée par l'acide trichloracétique), introduite en trois fois, pendant 6 heures. L'hydrolyse chymotrypsique est faite dans les mêmes conditions, sur le résidu non hydrolysé de l'hydrolyse trypsique.

Le surnageant est lyophilisé et pesé.

L'électrophorèse est faite en tampon butanol-acétique de pH 6,4, sur papier Whatmann 3 MM de 15 cm de largeur sur 140 cm de longueur. Le dépôt fait à 20 cm du milieu de la feuille contient 2 mg de protéine dans 20 microlitres d'eau. L'électrophorèse est faite à froid sous 5.000 volts pendant 3 heures. L'intensité est de 45 m Amp.

Après séchage du papier, on fait dans un deuxième temps, dans une direction perpendiculaire à celle de l'électrophorèse, une chromatographie ascendante en milieu alcool isoamylique-pyridine-eau pendant 3 heures.

Les colorations employées ont été pour l'ensemble des peptides, la ninhydrine à 0,5 % dans l'acétone. Les colorations spécifiques ont été faites, celle de l'arginine par le réactif de SAKAGUCHI à la 8-hydroxy-quinoléine (44), celles de la tyrosine et du tryptophane par le réactif à l' α -nitroso- β -Naphтол (1), celles de l'histidine par la réaction de PAULY à l'acide sulfanilique diaoté (7), celles des peptides à soufre divalent par le réactif à l'iodure de platine (96).

SÉPARATIONS SELON L'ÂGE

Les séparations ont été faites par centrifugations différentielles en sérum albumine bovine à 30 % selon la technique de PRANKERD (75). Les globules rouges séparés du plasma par centrifugation sont mélangés volumes à volume avec la sérum albumine, puis centrifugés dans des tubes plastiques 10 minutes à 3.000 g et 5 minutes à 12.000 g.

Après décantation du surnageant, on prélève séparément le quart supérieur et le quart inférieur du culot, qui sont remis en suspension dans la sérumalbumine et centrifugés à la même vitesse que précédemment, mais dans des tubes plus étroits. On décante le surnageant et prélève le tiers supérieur de la suspension contenant les globules rouges les plus légers, le tiers inférieur de la suspension contenant les globules rouges les plus denses, qui seront comparés à la zone moyenne de la première centrifugation. Les globules rouges de tous les échantillons sont alors lavés six fois au chlorure de sodium isotonique à froid, puis les hémoglobines sont préparées par relargage par la solution de phosphates 3,5 M.

SYNTHÈSE D'HÉMOGLOBINE PAR LES RÉTICULOCYTES DU SANG

Les incubations de réticulocytes en présence de ^{59}Fe ont été faites selon la méthode de BORSOOK et coll. (9) légèrement modifiée.

Vingt millilitres de culot globulaire sont lavés deux fois avec la solution de Krebs-Henseleit (solution contenant : NaCl 9 g % - KCl 0,460 g - CaCl_2 , 2 H_2O 0,480 g - KH_2PO_4 0,210 g - Mg SO_4 , 7 H_2O 0,382 g pour 1.000 ml, et ajustée à pH 7,0 par du bicarbonate de sodium). On ajoute 4 ml d'une solution de 17 acides aminés, chacun à la concentration de 10^{-3} M (glycocolle, L. alanine, L. leucine, L. isoleucine, L. sérine; L. cystéine, L. phenylalanine, L. tyrosine, L. tryptophane, L. histidine, L. méthionine, L. proline; L. acide glutamique, L. acide aspartique, L. arginine, L. lysine, L. thréonine) dissous dans la solution de Krebs-

Henseleit. On ajoute 30 microcuries de ^{59}Fe (correspondant à 1 ou 2 microgrammes de fer) dilués dans 20 microgrammes de fer non radioactif (citrate de fer). On complète enfin le mélange à 40 ml avec la solution de Krebs-Henseleit.

Le mélange est réparti en portions de 10 millilitres dans des béchers de 30 millilitres. Les incubations sont faites dans un appareil de Dubnoff à 37° sous une atmosphère de 95 % de O_2 et 5 % de CO_2 avec agitation.

Dans les expériences où nous avons eu à ajouter en milieu d'incubation du fer non radioactif, nous avons employé pour cela une solution de Krebs-Henseleit contenant du sulfate ferreux et du citrate de sodium en quantité juste suffisante pour complexer le fer.

SYNTHÈSE D'HÉMOGLOBULINE PAR DES SYSTÈMES ACELLULAIRES DE RÉTICULOCYTES

Nous avons utilisé la technique de SCHWEET (89) modifiée par KRUH (49). Les globules lavés sont hémolysés à froid par quatre fois leur volume de chlorure de magnésium 5×10^{-3} M avec agitation. Puis on ajoute un volume d'une solution contenant 1,5 M de Saccharose et 0,15 M de chlorure de potassium. Une centrifugation de 10 minutes à 10.000 g élimine les cellules non hémolysées et les grosses particules.

Le surnageant est centrifugé 60 minutes à 105.000 g dans une ultracentrifugeuse Spinco préparative. Le précipité formé de ribosomes est purifié par un lavage et une deuxième ultra-centrifugation, repris par le milieu suivant :

Saccharose	0,35 M
MgCl_2	0,004 M
KCl	0,095 M
Tris pH 7,8	0,02 M

Le surnageant de l'ultra-centrifugation est conservé comme fraction soluble.

Le milieu d'incubation contient 0,5 ml de la suspension de ribosomes et 0,5 ml de fraction soluble. On y ajoute 2 micromoles d'ATP neutralisé, 20 micromoles de créatine phosphate neutralisé, 200 microgrammes de créatine phosphokinase, 0,25 micromole de GTP et 1 microcurie de valine ^{14}C dans 1 microgramme de valine. Le volume total est de 1,5 ml. Les incubations ont été réalisées dans un appareil de Dubnoff à 37° sous azote pendant 60 minutes.

A la fin de l'incubation on ajoute le surnageant de l'« enzyme pH 5 » en quantité suffisante pour que le total soit égal à 60 mg. On centrifuge 60 minutes à 105.000 g pour éliminer les ribosomes. Puis on dialyse contre le tampon de la chromatographie en concentrant jusqu'à un volume final de 3 millilitres.

La chromatographie est effectuée comme d'habitude. Après le fractionnement on ajoute aux fractions mineures une quantité connue d'hémoglobine comme entraîneur. La globine est alors précipitée par l'acétone chlorhydrique et préparée selon la technique d'ANSON et MIRSKY (3) pour la détermination de la radioactivité des différentes fractions.

CHAPITRE III

I. - MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE L'HÉMOGLOBINE DE LAPIN

Nous basant sur les résultats obtenus par ALLEN SCHROEDER et BALOG sur l'hémoglobine humaine (2), nous avons cherché à fractionner l'hémoglobine de lapin sur Amberlite IRC 50. En utilisant le tampon n° 1 ($\text{pH } 7,18 \pm 0,02$, $\text{Na}^+ 0,075 \text{ M}$) nous avons obtenu des résultats comparables à ceux décrits avec l'hémoglobine humaine en utilisant un tampon

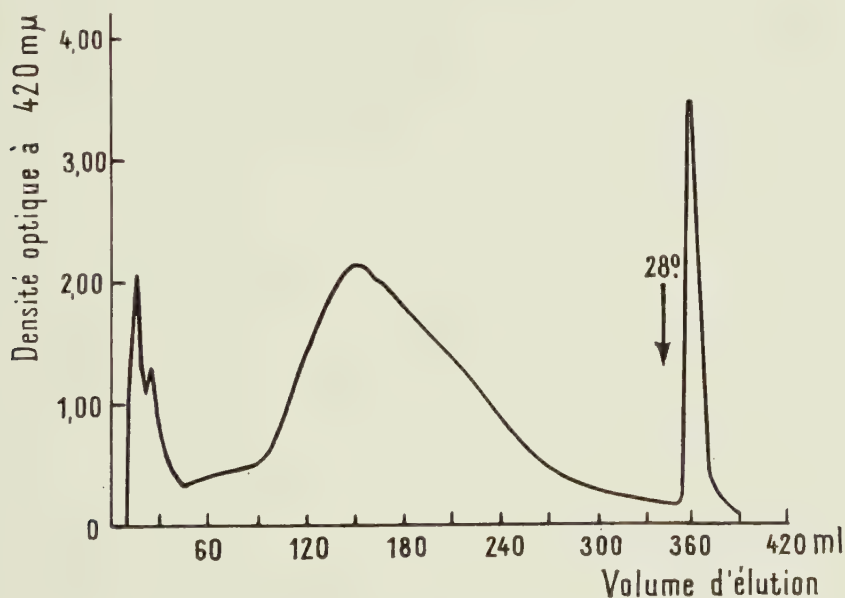


FIG. 1. — Courbe typique d'élution d'une hémoglobine de lapin sur Amberlite IRC 50 selon la technique de Schroeder et coll. en présence de Tampon n° 1 ($\text{pH } 7,18 \pm 0,02$ — $\text{Na}^+ 0,075 \text{ M}$ — $\text{KCN } 0,01 \text{ M}$).

différent). Nous avons ainsi, de façon reproductible, individualisé trois fractions (fig. 1).

1°) Une fraction d'élution rapide dont le front correspond au volume de rétention de la colonne et donc à un composant non adsorbé. Cette fraction est elle-même hétérogène, comme on peut le mettre en évidence

en utilisant un tampon plus acide et de molarité en sodium plus faible. Elle comporte alors au moins trois sous-fractions. Cette hétérogénéité n'est que partiellement mise en évidence avec le tampon que nous utilisons.

2°) Une fraction principale dont l'élution commence après 100 ml environ. Cette fraction constitue un pic large et asymétrique. La partie descendante est très lente, tendant à devenir parallèle à la ligne de base. Cette fraction ne s'élue pas totalement à froid, même si on attend deux ou trois jours.

3°) Le réchauffement de la colonne de chromatographie à 28° provoque l'élution très rapide en quelques tubes, correspondant au volume de rétention de la colonne, du reste de l'hémoglobine adsorbée.

Cette différence d'élution nous a fait suspecter l'existence d'une troisième fraction. L'examen des activités spécifiques des différents pics nous a montré ultérieurement que ce troisième pic correspond bien à une entité quand le réchauffement est opéré suffisamment tard (quand la D.O. est descendue à 0,100 sur 420 m μ). Nous avons été amenés dans certains cas à opérer ce réchauffement plus tôt. Le pic élué dans ce cas correspond à un mélange de fraction principale et de fraction lente.

La proportion des différentes fractions représente chez le lapin normal :

Fraction d'élution rapide	15 à 18 %
Fraction principale	75 à 80 %
Fraction d'élution lente	5 à 8 %

La comparaison de ces fractions avec celles qui ont été décrites par électrophorèse sur bloc d'amidon nous a amenés à adopter une nomenclature calquée sur celle de l'hémoglobine humaine :

- la fraction principale correspond à l'hémoglobine A_1 ;
- la fraction d'élution rapide correspond à la fraction mineure plus anodique à l'électrophorèse A_3 ;
- on sait que la fraction mineure A_2 de l'hémoglobine humaine n'a pas son équivalent dans les hémoglobines animales;
- nous avons appelé A_4 la fraction mineure d'élution lente, non individualisée par l'électrophorèse.

II. - ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES FRACTIONS ÉLUÉES

Ces fractionnements chromatographiques ont été effectués après marquage par injection de ^{59}Fe à des lapins, sur des échantillons prélevés à des temps variables après l'injection, entre la 16^e heure et le 38^e jour. Les résultats sont reproduits sur la figure 2. On observe :

- d'une part des différences de marquage entre les fractions;
- d'autre part une évolution différente de chaque fraction en fonction du temps qui s'est écoulé entre l'injection de ^{59}Fe et le prélèvement.

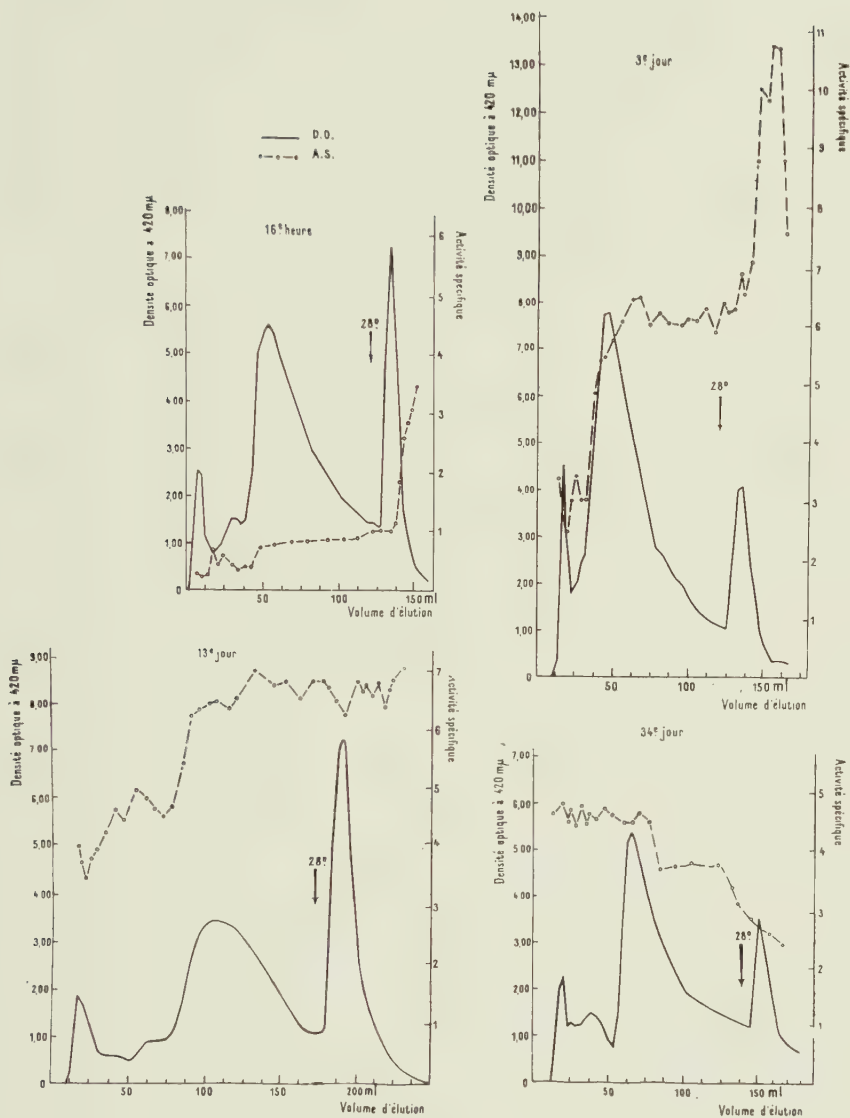


FIG. 2. — Activités spécifiques comparées des différentes fractions, en fonction du temps séparant l'injection à l'animal du précurseur radioactif et le prélèvement.

(Dans cette série de fractionnements, le réchauffement a été effectué plus tôt dans l'élution que nous ne l'avons fait ultérieurement, le pic élué à ce moment correspond à un mélange de fraction principale et de fraction lente.)

1^o) Sur les prélèvements précoces (1^{er} et 2^e jours) (figure 3), la fraction principale est marquée régulièrement. La fraction rapide présente une

activité spécifique plus basse et variable d'un tube à l'autre. La fraction lente, par contre, présente une élévation brusque de son activité spécifique à la fin de l'élution, au moment du réchauffement de la colonne.

2°) Sur les prélèvements ultérieurs on constate que l'évolution de l'activité spécifique des différentes fractions n'est pas la même. Celle de la fraction principale A_1 s'élève pendant les premiers jours, puis reste stable. Elle décrit la classique courbe « en plateau » de SHEMIN et RITTENBERG (90); la partie ascendante de cette courbe correspond à la période

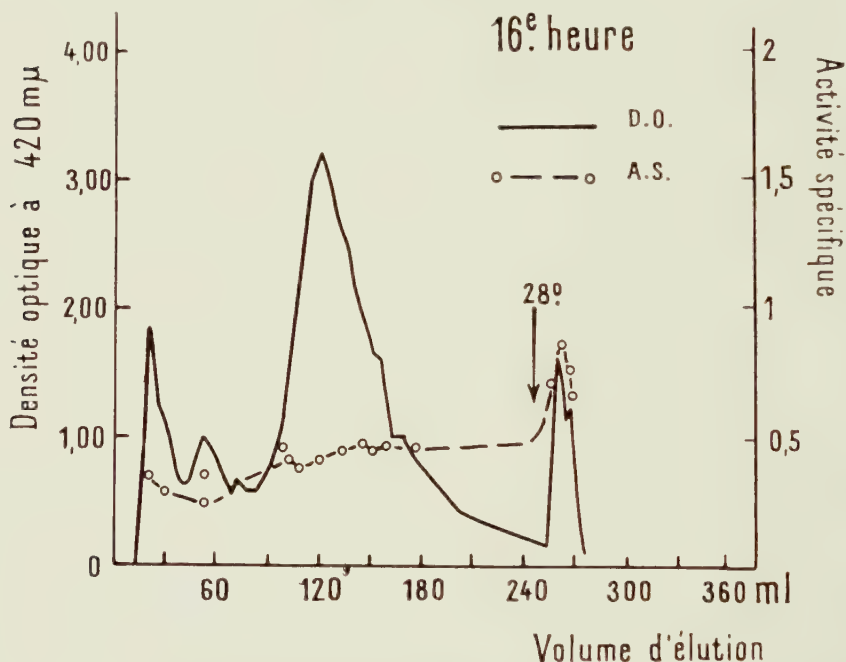


FIG. 3. — Activités spécifiques des différentes fractions sur un prélèvement fait 40 heures après l'injection de ^{59}Fe .
(Le réchauffement a ici été tardif.)

pendant laquelle l'isotope radioactif est présent dans les centres hématopoiétiques, le plateau jusqu'à l'approche du 40^e jour à la période d'inertie métabolique de l'hémoglobine. La décroissance de la courbe est masquée par le fait que le ^{59}Fe provenant de la destruction de l'hémoglobine est utilisé préférentiellement pour la synthèse de nouvelles molécules.

La fraction rapide a un comportement analogue à celui décrit pour la fraction anodique A_3 isolée sur bloc d'amidon. Son activité spécifique s'élève progressivement avec le temps. La courbe de cette activité spécifique croise celle de la fraction principale vers le 40^e jour après l'injection du précurseur marqué.

Quant à la fraction d'élution lente, elle subit une évolution totalement différente. La courbe de son activité spécifique en fonction du temps, très élevée dans les premiers jours, avec un maximum vers le 2^e ou 3^e jour, décroît ensuite rapidement. La décroissance en deux phases peut s'expliquer par une contamination partielle. Elle rejoint celle de la fraction principale vers le 10^e jour. Les points compris entre le 10^e et le 20^e jour n'ont pas de valeur significative différente de celle de la fraction principale. Dans les fractionnements effectués sur des prélèvements

TABLEAU I. — *Lapins marqués au ^{59}Fe*

ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE			
	Fraction A_3	Fraction A_1	Fraction A_4
1 ^{er} lapin : 16 ^e heure	0,5	0,9 à 1	1,5 à 2
3 ^e jour	3 à 4	5	5 à 6
11 ^e jour	2,5	3	3 à 4
38 ^e jour	2	1,5 à 2	1,5
2 ^e lapin : 16 ^e heure	0,5	1	3 à 4
3 ^e jour	3	6	8 à 10
13 ^e jour	4	6 à 7	6 à 7
34 ^e jour	4 à 5	4 à 5	3
3 ^e lapin : 16 ^e heure	0,25	0,5	0,8 à 1
5 ^e jour	1	2 à 2,5	2,5 à 3
20 ^e jour	1,5	2	2
37 ^e jour	1 à 1,5	1 à 1,5	0,8
4 ^e lapin : 24 ^e heure	1	2	4 à 5
5 ^e lapin : 16 ^e heure	0,5	1	1,5
6 ^e lapin : 40 ^e heure	0,5	0,9 à 1	1,5 à 1,9

Activités spécifiques comparées des différentes fractions chromatographiques au cours de plusieurs séries d'expériences (lapins marqués au ^{59}Fe).

tardifs, à l'approche du 40^e jour, l'activité spécifique de la fraction lente présente une valeur sensiblement plus faible, d'environ 20 %, que celle de la fraction principale.

Ces résultats ont été retrouvés constamment chez tous les lapins traités dans les mêmes conditions (tableau I).

Nous avons schématisé les résultats en étudiant l'activité spécifique des différentes fractions en fonction du temps après injection du ^{59}Fe (fig. 4).

On constate que la fraction principale possède le comportement classiquement décrit pour l'hémoglobine totale et qui correspond à la durée de vie des globules rouges. La fraction rapide correspond à de l'hémoglobine « vieillie ». La modification de son comportement électrophorétique s'explique par le changement de charge des molécules marquées au cours de la vie du globule rouge et ne fait pas l'objet de notre étude.

Par contre nous sommes amenés à considérer la fraction d'élution lente que nous avons appelée A_4 de haute activité spécifique dans les

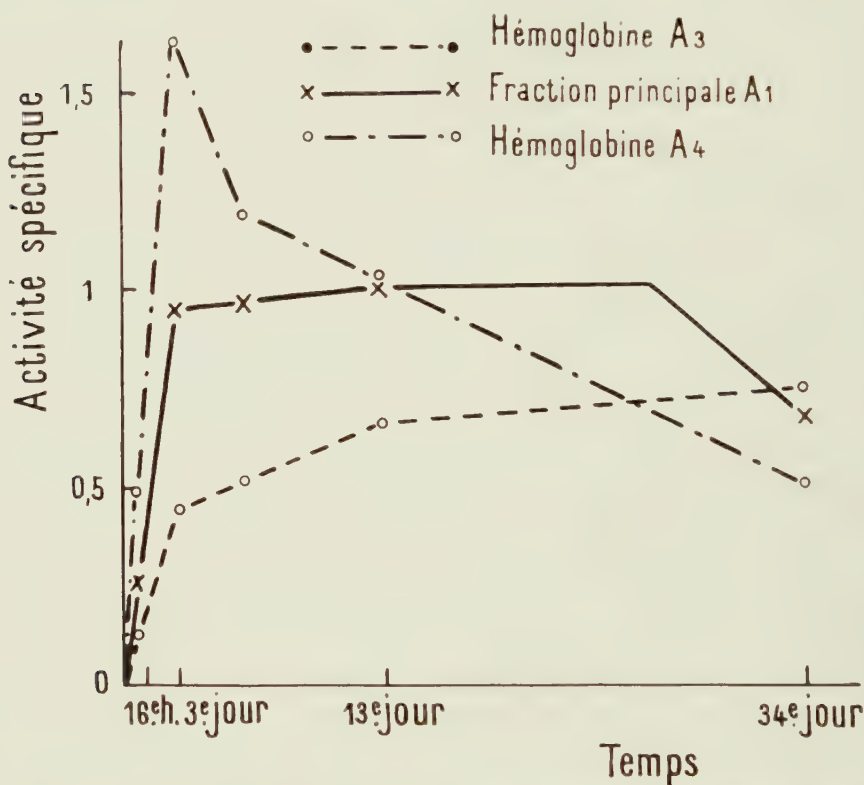


FIG. 4. — Courbe schématique de l'activité spécifique comparée des différentes fractions en fonction du temps.

La courbe en traits pleins est celle de l'Activité Spécifique de la fraction principale A_1 . Pendant la période stable du « plateau » elle est posée égale à 1.

jours qui suivent l'injection, comme une hémoglobine « jeune ». Cependant, avant d'essayer d'interpréter sa signification, il fallait d'abord prouver que la cinétique apparente du ^{59}Fe précurseur n'était pas due à une contamination par un composé non hémoglobinique, c'est-à-dire effectuer les critères de pureté sur cette fraction d'élution lente. Il nous fallait aussi contrôler la valeur de notre fractionnement. La constance

de l'activité spécifique calculée tube par tube dans chaque fraction est déjà une bonne indication. Nous avons voulu vérifier, au cours d'une seconde chromatographie, le comportement des fractions isolées une première fois.

La fraction principale A_1 a été préparée à partir de deux fractions correspondantes obtenues par deux chromatographies simultanées de la même hémoglobine de lapin. Les fractions A_1 réunies ont été concen-

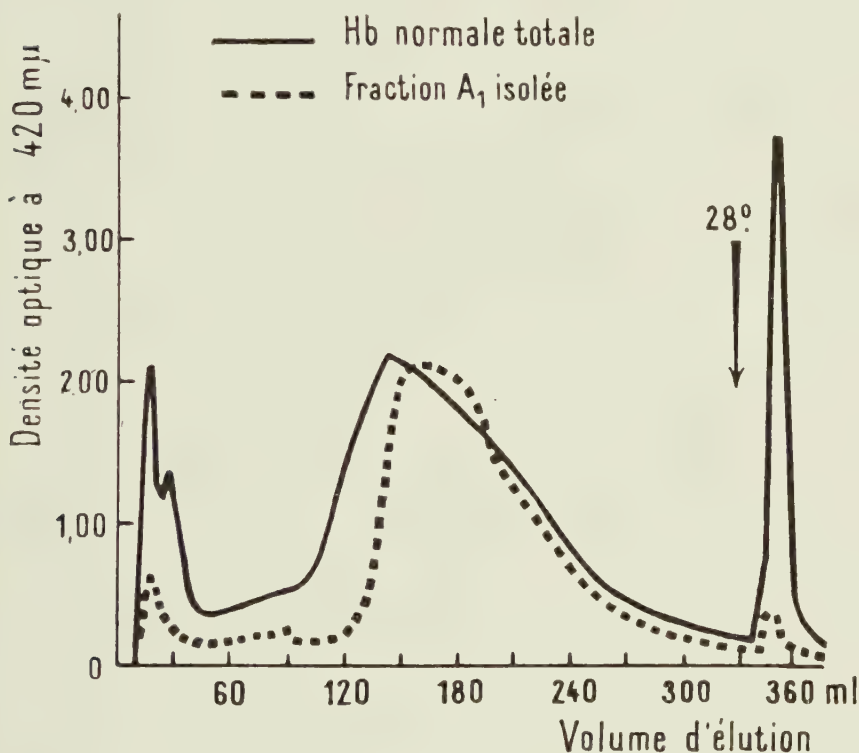


FIG. 5. — Courbes d'élution chromatographique comparées d'une hémoglobine de lapin totale et de la fraction principale A_1 isolée au cours d'une première chromatographie (lapin normal).

trées par dialyse sous vide, puis on en a fait une seconde chromatographie (fig. 5). On voit que presque toute l'hémoglobine s'élue alors au niveau du pic principal. Il n'y a que des traces de fraction A_3 et pas de fraction A_4 .

En ce qui concerne la fraction A_4 , pour des raisons d'ordre pratique, nous avons été amenés à effectuer le fractionnement à partir d'une hémoglobine de lapin réticulocytaire, permettant d'en préparer une quantité supérieure. Une deuxième chromatographie (fig. 6) de cette

fraction, isolée et concentrée, montre qu'elle s'élue presque entièrement de façon tardive. Il n'y a pas de fraction A_3 et très peu de fraction A_1 .

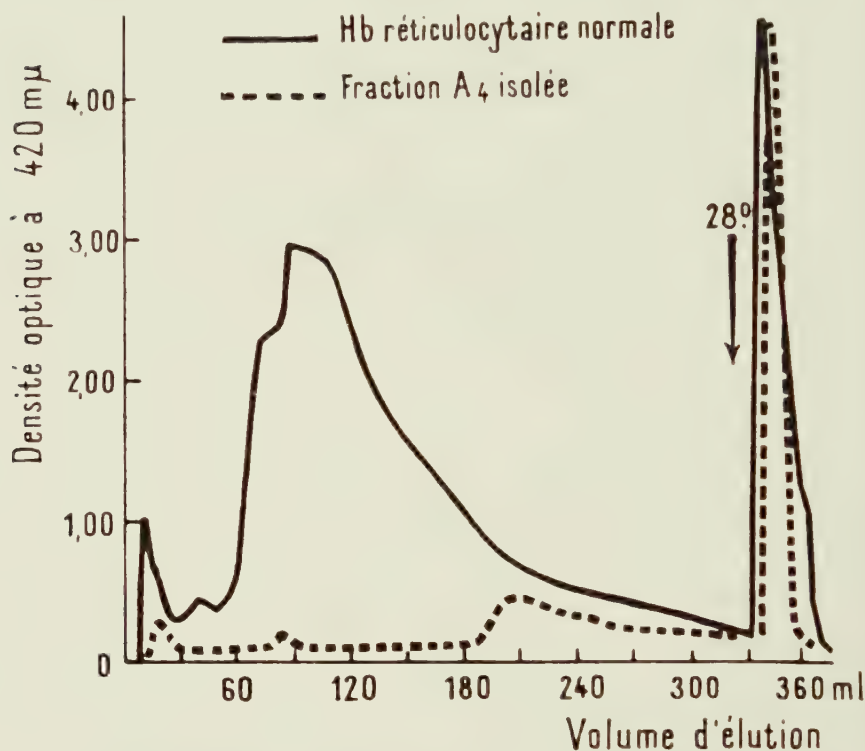


FIG. 6. — Courbes d'élution chromatographique comparées d'une hémoglobine de lapin totale et de la fraction d'élution lente A_4 isolée au cours d'une première chromatographie (lapin présentant une réticulocytose à 90 p. 100 après intoxication par le chlorhydrate de phénylhydrazine).

Ceci montre bien que la chromatographie a permis de séparer des fractions définies dont le comportement chromatographique reste inchangé.

CHAPITRE IV

CRITÈRES DE PURETÉ DE LA FRACTION INDIVIDUALISÉE

La fraction chromatographique « Λ_1 » étant définie, il nous fallait établir qu'il s'agit bien d'une hémoglobine pure.

En effet, l'évolution de l'activité spécifique de cette fraction en fonction du temps écoulé depuis l'injection de ^{59}Fe pourrait être due à l'élution, en fin de chromatographie, d'une protéine autre que l'hémoglobine, et qui n'en aurait pas été séparée par le relargage en phosphates 3,5 M, ferroprotéine non héminique ou hémoprotéine autre que l'hémoglobine.

I. - CHROMATOGRAPHIE D'UNE HÉMOGLOBINE MARQUÉE AU GLYCOCOLLE ^{14}C

Dans des conditions très différentes des nôtres, GREENOUGH, PETERS et THOMAS (27) ont décrit une ferroprotéine intraglobulaire précurseur de l'hémoglobine. Après incorporation *in vitro* de ^{59}Fe ou de leucine ^{14}C par des suspensions de cellules de moelle d'homme ou de chien, ils ont préparé des hémolysats peu purifiés et les ont fractionnés sur Amberlite IRC 50. L'élution chromatographique isole une première fraction qui sort avec le front du solvant, ferroprotéine non héminique, dont la cinétique d'incorporation en fonction du temps comparée à celle de la fraction principale, montre qu'il peut s'agir d'un précurseur de l'hémoglobine. Cette fraction, différente de la sidérophiline et de la ferritine, est interprétée comme une sidéroglobine qui s'unirait ultérieurement à la proto-porphyrine pour former l'hémoglobine.

Malgré nos conditions totalement différentes, nous avons voulu nous assurer que nous ne nous trouvions pas en présence d'un phénomène comparable. Nous avons cherché si l'utilisation d'un précurseur radioactif autre que le ^{59}Fe nous permettait de résoudre le problème. Pour cela nous avons injecté à un lapin 11 mg de glycolle d'A.S. 2 mc/mM, soit 300 μC de glycolle ^{14}C ; l'incorporation de ce précurseur se faisant simultanément et à des vitesses identiques dans l'hème et dans la globine, ainsi que l'ont montré DREYFUS et coll. (9).

Le sang a été prélevé à la 40^e heure après l'injection de glycolle ^{14}C . Dans chaque fraction la séparation de l'hème et de la globine a été opérée par précipitation à l'acétone chlorhydrique selon la technique d'ANSON et MIRSKY (3). La globine, lavée à l'acétone, puis à l'éther, a été préparée sous forme de pastilles comprimées de 1 cm² de surface sous une pression de 400 kgs/cm². L'hème, repris sous forme d'hémochro-

mogène de pyridine, puis desséché par évaporation et amené à poids constant, a été pesé à l'ultramicrobalance. Les radioactivités ont été mesurées à l'aide d'un compteur sans fenêtre.

L'inégalité de marquage a été retrouvée entre fraction principale et fraction d'élution lente. Le rapport des activités spécifiques de ces deux fractions est identique dans l'hème et dans la globine. Il est le même qu'après marquage au ^{59}Fe (tableau II).

	ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE c.m./mg		$\frac{\text{A.S. } A_4}{\text{A.S. } A_1}$
	Fraction A_1	Fraction A_4	
Globine	23,5	42	1.8
Hémine	490	1.200	2.2

TABLEAU II. — *Activités spécifiques comparées des différentes fractions chromatographiques (lapin marqué au gly. ^{14}C) prélèvement fait à la 40^e heure.*

Cette incorporation parallèle du ^{59}Fe et du $\text{Gl } ^{14}\text{C}$ dans l'hème et dans la globine est donc bien en faveur d'une synthèse d'hémoglobine.

II. - CONTRÔLES DE PURETÉ PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AMIDON

Nous avons recherché la présence éventuelle, dans la fraction « lente », d'une contamination protéique de quelque nature qu'elle soit. Nous avons fait des électrophorèses en gel d'amidon sur des fractions concentrées par dialyse sous vide selon la technique d'HUEHNS et SHOOTER (32) :

- en tampon borate 0,03 M, pH 8,6, selon la formule classique de SMITHIES (94) (95) (28);
- en tampon phosphate 0,01 M, pH 7;
- en tampon phosphate 0,033 M, pH 6,5, selon la technique décrite par FESSAS (23);
- en tampon tris pH 9,5, selon la technique décrite par HAUT et coll. (30).

Ces deux derniers milieux en particulier ont été utilisés avec l'hémoglobine humaine pour faire apparaître les constituants mineurs.

Dans tous les cas, nous n'avons eu, pour la fraction d'évolution lente comme pour la fraction principale, qu'une seule bande de migration.

III. - CONTRÔLE DES SPECTRES D'ABSORPTION

Nous avons voulu enfin éliminer, dans la fraction « lente », la présence d'une chromoprotéine autre que l'hémoglobine. Certaines se trouvant en fait déjà écartées par les expériences précédentes.

Les catalases sont parfaitement mises en évidence par électrophorèse en gel d'amidon, en particulier à pH 9,5, dans des hémoglobines peu purifiées, par exemple lorsque la purification a été simplement faite par traitement au toluène (18). Un colorant des peroxydases, o-dianisidine ou benzidine, en présence de peroxyde d'hydrogène, fait apparaître une bande colorée au niveau de laquelle se produisent des bulles d'oxygène dans le gel. Cette technique, appliquée à l'hémoglobine de lapin obtenue par relargage, ainsi qu'aux fractions obtenues à partir de celles-ci, n'a pas révélé la présence de catalase. Cette impureté n'est donc pas présente dans nos préparations d'hémoglobine.

La myeloperoxydase des globules blancs, que l'on pourrait retrouver dans un hémolysat mal purifié, est également éliminée par le relargage, étant beaucoup moins soluble que l'hémoglobine de lapin.

La methemoglobine-réductase, non totalement éliminée par les phosphates 3,5 M, a été parfaitement identifiée et décrite (62) (33). Elle n'est pas adsorbée sur Amberlite IRC 50 et s'élue avec la branche montante de la fraction d'élution rapide, elle ne risque donc pas de contaminer la fraction d'élution lente.

Mais il ne s'agit pas là de toutes les chromoprotéines du globule rouge. MORRISON (65) a récemment décrit dans les globules rouges humains une hémoprotéine dont le groupement prosthétique comporte un seul noyau porphyrine et qui jouerait un rôle dans la chaîne de transport des électrons.

Pour éliminer toute possibilité de contamination par une chromoprotéine décrite ou non, nous avons examiné le spectre de notre fraction d'évolution lente, comparativement à celui de la fraction principale d'hémoglobine*.

Etant donné que les fractions obtenues se présentent à des états d'oxydation différents, nous les avons toutes transformées en cyanmethémoglobine, en prenant soin d'éliminer tout le ferricyanure. Les spectres d'absorption ou ultra-violet, en lumière visible et plus particulièrement aux longueurs d'onde correspondant à la bande de Soret, se sont révélés identiques, avec un maximum à 420 mμ, correspondant à la bande de Soret en cyanmethémoglobine.

Nous avons calculé les rapports des absorptions aux différentes longueurs d'onde : rapport de chaque maximum aux deux minima qui l'encadrent, rapport des différents maxima entre eux.

Ces deux séries de rapports fournissent un critère de pureté et un critère d'identité (tableau III). Elles sont les mêmes dans les deux fractions : il n'existe donc pas d'impureté ainsi décelable dans la fraction d'élution lente.

Pour nous assurer de l'identité du groupement prosthétique dans les deux fractions, principale et lente, nous avons, après séparation de l'hème

* Perkin Elmer, 137 U.V.

Absorption comparée des fractions A₁ et A₄
aux différentes longueurs d'onde du spectre

ABSORPTION A :	257 μ	275 μ	308 μ	361 μ	372 μ	420 μ	504 μ	540 μ
Fraction A ₁	0,448	0,474	0,206	0,486	0,470	1,590	0,116	0,158
Fraction A ₄	0,435	0,461	0,212	0,468	0,455	1,570	0,114	0,159

Critères de *pureté* de la protéine = Rapport de chaque maximum
aux minima voisins

	$\frac{275}{257}$	$\frac{275}{308}$	$\frac{361}{308}$	$\frac{361}{372}$	$\frac{420}{372}$	$\frac{420}{504}$	$\frac{540}{504}$
Fraction A ₁	1,06	2,3	2,36	1,03	3,38	13,7	1,36
Fraction A ₄	1,06	2,17	2,22	1,03	3,45	13,8	1,39

Critère d'identité des deux fractions = Rapports des maxima entre eux

	$\frac{360}{275}$	$\frac{415}{275}$	$\frac{540}{275}$	$\frac{415}{360}$	$\frac{540}{360}$	$\frac{415}{540}$
Fraction A ₁	1,03	3,36	0,334	3,28	0,326	10
Fraction A ₄	1,02	3,40	0,343	3,35	0,340	9,9

TABLEAU III. — *Spectres d'absorption comparés des fractions A₁ et A₄.*

et de la globine, examiné comparativement les spectres des deux hémochromogènes en solution dans la pyridine). Ces spectres se sont révélés identiques (66) (68).

IV. - ETUDE DU COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION

Les deux hémoglobines ont été soumises à une ultracentrifugation analytique (95). Celles-ci ont révélé les vitesses de sédimentation suivantes (fig. 7) :

$$A_1 = 4,41 \text{ S} \pm 0,09$$

$$A_2 = 4,25 \text{ S} \pm 0,08$$

Ces résultats permettent d'éliminer une dissociation ou une association des chaînes peptidiques différentes dans A_4 . (Ces centrifugations ont été réalisées grâce à l'obligeance du Docteur VAN RAPENBUSCH au Laboratoire de Chimie Physique de l'Institut de l'Etude des Maladies du sang.)

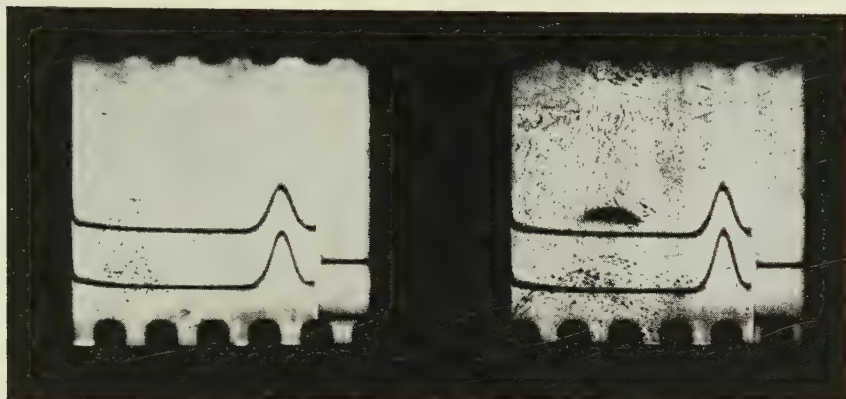


FIG. 7. — Ultra centrifugation simultanée de A_1 (tracé inférieur) et de A_4 (tracé supérieur), à 59.780 tpm.

Température 20°,0 C. ($\pm$ 0.05)

Intervalle photos 4 mn.

V. - INÉGALITÉS DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE L'HÉMINE CRISTALLISÉE A PARTIR DES DEUX HÉMOGLOBINES A_1 ET A_4

Nous avons voulu nous assurer que l'inégalité de marquage entre les fractions A_1 et A_4 était retrouvée dans le même rapport après préparation de l'hémine cristallisée des deux fractions.

Un fractionnement d'hémoglobine a été fait dans les conditions habituelles à partir d'un sang prélevé 40 heures après l'injection de ^{59}Fe . Les fractions A_1 et A_4 après vérification de l'inégalité de marquage ont été concentrées et dosées. Après addition d'une quantité connue d'hémoglobine entraîneur l'hémine a été cristallisée selon la technique de LABBE et NISHIDA (54). Puis l'hémine cristallisée a été reprise par 2 ml de pyridine anhydre et la radioactivité déterminée sur la totalité de l'hémochromogène. Les résultats obtenus ont été les suivants :

A.S. de la fraction A_1 = 631 c.m./mg d'hémoglobine

A.S. de la fraction A_4 = 1.358 c.m./mg d'hémoglobine

Le rapport des activités spécifiques, supérieur à 2, était le même que celui des deux fractions hémoglobiniques.

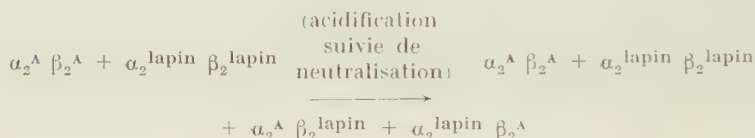
VI. - ETABLISSEMENT DE LA NATURE HÉMOGLOBINIQUE DE LA FRACTION A_4 PAR HYBRIDATIONS INTERSPÉCIFIQUES

Nous avons enfin utilisé pour établir la nature hémoglobinique de la fraction A_4 , la méthode des hybridations interspécifiques.

On sait en effet que l'hémoglobine est constituée de 4 chaînes polypeptidiques semblables deux à deux : les chaînes α et β (39). L'hémoglobine de l'homme ou hémoglobine A peut être symbolisée ainsi $\alpha_2^A \beta_2^A$, celle de lapin $\alpha_2^{\text{lapin}} \beta_2^{\text{lapin}}$.

Sous l'effet d'une acidification à pH 4,7 l'hémoglobine subit une dissociation, et les constituants se réassocient lors d'une neutralisation secondaire (43) (92).

Si on dissocie simultanément les hémoglobines de deux espèces différentes, il y a formation de quatre subunités différentes. La réassociation, lors de la neutralisation, peut conduire alors aux protéines d'origine, et à des hybrides, comportant des subunités de chacune des deux espèces.



Cette hybridation est réalisable entre hémoglobine de lapin et hémoglobine humaine, mais incomplètement. Nous avons montré qu'en utilisant un mélange formé d'un part d'hémoglobine de lapin et 2 parts d'hémoglobine humaine, on augmentait la proportion d'hybrides formés (55).

Cette méthode peut être utilisée comme test de pureté en étudiant comparativement les activités spécifiques des hybrides formés entre l'hémoglobine A_1 de lapin et l'hémoglobine humaine d'une part, entre l'hémoglobine A_4 de lapin et l'hémoglobine humaine d'autre part. Une impureté non hémoglobinique de la fraction A_4 ne devrait pas accompagner les chaînes α et β dans leurs réassociation. L'inégalité de marquage des deux fractions doit se retrouver dans les hybrides respectifs, si cette inégalité de marquage porte réellement sur les chaînes hémoglobiniques.

Une hémoglobine préparée à partir d'un sang prélevé 40 heures après l'injection de ^{59}Fe à l'animal a été fractionnée selon la technique habituelle. Les fractions A_1 et A_4 ont été recueillies. Le rapport de leurs activités spécifiques était de 1,9. Les fractions, une fois concentrées ont été mélangées à une quantité deux fois supérieure d'hémoglobine humaine. Les mélanges ont été dialysés 24 heures contre tampon acétate pH 4,7, puis neutralisés par dialyse à pH 7. L'électrophorèse sur le même bloc d'amidon des deux mélanges a montré des résultats qualitativement identiques (figure 8). Quatre fractions individualisées correspondent aux deux hémoglobines d'origine et aux hybrides néoformés : un hybride antérieur $\alpha_2^{\text{lapin}} \beta_2^A$ et un hybride postérieur $\alpha_2^A \beta_2^{\text{lapin}}$.

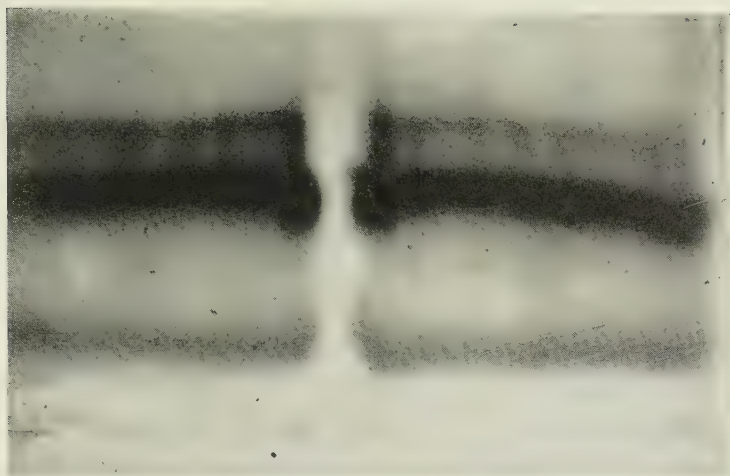


FIG. 8. — Hybridations comparées de la fraction A_1 de lapin et d'hémoglobine humaine, et de la fraction A_4 de lapin et d'hémoglobine humaine.
Electrophorèse de contrôle sur bloc d'amidon en tampon véronal 0,05 M pH 8,6.
Migration sous 330 V. 60 mAmp. pendant 16 heures.

Ces deux hybrides ont été élués à partir des blocs d'amidon et leur activité spécifique déterminée après transformation en Cyanmethémoglobine (tableau IV).

L'ingélité de marquage des fractions A_1 et A_4 se situe donc bien dans l'hémoglobine elle-même et on la retrouve dans les deux chaînes.

	HYBRIDE ANTÉRIEUR	HYBRIDE POSTÉRIEUR
Fraction A_1	118 c.m./mg Hb.	238 c.m./mg Hb.
Fraction A_4	189 c.m./mg Hb.	447 c.m./mg Hb.

TABLEAU IV. — Activités spécifiques comparées des hybrides formés par la fraction A_1 et la fraction A_4 avec une hémoglobine humaine.

CHAPITRE V

ÉTUDE COMPARÉE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES HÉMOGLOBINES A₁ ET A₄

Dans le chapitre précédent nous avons appliqué les critères de pureté à la fraction A₄ et montré qu'aucune contamination ne pouvait expliquer ni le comportement chromatographique ni la cinétique d'incorporation en fonction du temps. Nous nous sommes efforcés de résoudre le problème d'une différence éventuelle de structure chimique entre la fraction A₄ et la fraction principale A₁, permettant d'expliquer la différence de leurs comportements chromatographiques.

Les tests physico-chimiques, vus au chapitre précédent, et utilisés pour prouver la pureté de la fraction A₄, ont été appliqués simultanément à la fraction A₁. L'identité des résultats est en faveur de l'identité de structure entre les deux fractions.

1°) *Electrophorèses comparées des deux fractions A₁ et A₄ à différents pH.*

Ces électrophorèses ont été faites pour vérifier l'absence de toute contamination. Elles nous ont montré, à différents pH que nous avons employés, une migration identique de A₁ et de A₄. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de charge électrique correspondant à la différence de comportement chromatographique.

2°) *Comparaison des spectres d'absorption de A₁ et A₄.*

Nous avons vu également, comme critère de pureté de la fraction A₄ que son spectre d'absorption est identique à celui de la fraction A₁. Il n'y a donc pas, entre les deux fractions, de différence de structure dans le groupement prosthétique, observable par spectroscopie.

3°) *Hybridations interspécifiques.*

Enfin, l'observation des hybrides formés entre l'hémoglobine A₁ de lapin et l'hémoglobine humaine d'une part, entre l'hémoglobine A₄ de lapin et l'hémoglobine humaine d'autre part nous a montré dans les deux cas la formation d'hybrides interspécifiques. Les mélanges à comparer, après dialyse de 24 heures contre un tampon acétate pH 4,7 et neutralisation secondaire, ont été ensuite examinés par électrophorèse ;

- sur bloc d'amidon en tampon véronal 0,05 M pH 8,6
- sur gel d'amidon en système discontinu tris-borate pH 8,6 (74) et en tampon phosphate pH 7,4 (25).

Les électrophorèses de contrôle ont abouti dans tous les cas à la mise en évidence, à côté des constituants initiaux, de deux constituants néo-formés, l'un de migration plus anodique que l'hémoglobine humaine, l'autre de migration plus cathodique que l'hémoglobine de lapin. Dans tous les cas les résultats étaient qualitativement et quantitativement identiques pour A_1 et pour A_4 . Par conséquent, cette méthode ne permet pas de mettre en évidence des différences de charge ou d'affinité vis à vis des chaînes d'hémoglobine humaine, des chaînes α et β des deux fractions d'hémoglobine de lapin.

4°) *Electrophorèse-chromatographie des hydrolysats tryptiques.*

Nous avons enfin recherché une différence de structure primaire de la globine par l'étude des hydrolysats tryptiques des fractions A_1 et A_4 (38) (6). Ces hydrolysats ont été étudiés par électrophorèse-chromatographie. Cette méthode des « Fingerprints » ainsi que la technique d'hydrolyse ont été décrites au chapitre II. La comparaison des « Fingerprints » obtenus après attaque tryptique de la fraction principale A_1 et de la fraction d'élution lente A_4 , suivie d'électrophorèse-chromatographie sur papier, ne nous a révélé aucune différence de structure. Les peptides retrouvés dans l'un et l'autre cas sont les mêmes après coloration par la Ninhydrine ou après colorations spécifiques de la tyrosine et du tryptophane (1), de l'histidine (7), de l'arginine (44) et du soufre divalent (96).

5°) *Constituants peptidiques associés à l'hémoglobine.*

N'ayant retrouvé aucune différence de structure primaire nous avons cherché si l'association de l'hémoglobine à un autre composé chimique pouvait expliquer la différence de comportement chromatographique. Il a ainsi été établi (70) (Rosa, Th. de Sc. en cours) que la fraction A_3 était due à la fixation du glutathion sur la molécule d'hémoglobine. Nous avons cherché si une dénaturation thermique pouvait libérer d'une des fractions un composé éventuel ainsi fixé.

On a constaté également (Rosa, Th. de Sciences en cours) que la dénaturation en milieu modérément alcalin à pH 8 libérait 5 peptides que l'on pouvait mettre en évidence par électrophorèse à 5.000 volts. Ces peptides ne sont pas vraisemblablement fixés par une liaison peptidique au reste de la molécule.

De tels peptides, combinés différemment aux fractions A_1 et A_4 pourraient expliquer les différences de comportement chromatographique. Nous avons dénaturé par chauffage à 90° pendant 10 minutes à pH 8 les fractions A_1 et A_4 amenées à une concentration de 2 %. L'hémoglobine précipite dans ces conditions, le surnageant ainsi que les liquides de lavage du précipité sont réunis lyophilisés. Les lyophilisats obtenus à partir de chacune des fractions sont soumis à une électrophorèse à 5.000 volts pendant trois heures en tampon butanol acétique à pH 6,4. On obtient dans les deux cas cinq taches peptidiques révélables à la ninhydrine. Dans les deux cas les résultats ont été identiques. Une association différente des peptides ne peut donc être invoquée pour expliquer le comportement chromatographique particulier de la fraction A_4 . Par

ailleurs on peut éliminer l'association à la fraction A_4 d'une molécule protéique qui modifierait l'absorption de la protéine en ultra-violet.

6°) *Hypothèse d'une différence de structure secondaire ou tertiaire.*

Ces expériences ne permettent donc pas de mettre en évidence de différence de structure primaire entre les fractions A_1 et A_4 . Nous sommes donc amenés à postuler des différences de structure secondaire ou tertiaire entre les deux fractions. De telles différences ont également été postulées par EDMUNDSON et HIRS (22) pour expliquer l'existence de plusieurs myoglobines isolées par chromatographie sur Amberlite IRC 50 et ne présentant aucune différence de structure primaire. Une telle différence de structure qui se traduirait par des différences de réactivité des groupements polaires serait compatible avec des modifications d'affinité pour les groupements actifs de la résine échangeuse d'ions.

CHAPITRE VI

INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE

A côté du problème de la différence de structure chimique éventuelle entre la fraction principale A_1 et la fraction d'élution lente A_4 , que nous n'avons pu établir, mais que nous ne saurions éliminer, il reste le problème de l'interprétation biologique de cette fraction.

En effet, si cette fraction « lente » peut être considérée comme de l'hémoglobine localisée dans des globules rouges de formation récente, on peut cependant l'interpréter de deux manières différentes.

1°) On peut penser qu'il s'agit d'une hémoglobine « jeune », précurseur métabolique de l'hémoglobine adulte, localisée dans les globules rouges les plus récemment formés. Après quelques jours elle se transformerait en hémoglobine adulte, formant la fraction principale des globules rouges adultes.

2°) Mais on peut aussi envisager l'existence d'une population de globules rouges différente, à durée de vie plus courte que les globules rouges normaux. Une telle population a déjà été envisagée par DREYFUS et coll. (2) étudiant les phases initiales de l'hémoglobino-poïèse et rapprochant leurs observations de l'élimination précoce de stercobiline marquée observée par LONDON (69). L'hémoglobine de cette population de globules rouges pourrait n'être pas la même que celle de l'ensemble des globules rouges, et cette hémoglobine particulière serait éluee plus lentement que celles des autres globules rouges sur résine échangeuse de cations. Nous avons cherché des arguments en faveur de l'une ou l'autre de nos hypothèses.

1°) *Expériences de « chasse » in vivo du ^{59}Fe par du fer non radioactif.*

Ces expériences nous ont servi à mieux préciser la durée du phénomène que nous observions. Après injection du ^{59}Fe , des lapins ont reçu des injections intra-musculaires quotidiennes de fer-dextrane non radioactif à la dose de 20 mg par jour. Dans ces conditions, le fer non radioactif injecté après l'isotope radioactif dilue celui-ci dans les centres hématopoïétiques, les molécules d'hémoglobine formées à partir de ce moment ne seront pas marquées. On peut ainsi suivre l'évolution d'une hémoglobine dont la date de l'injection du précurseur radioactif marque le début de la synthèse, sans l'erreur possible due aux molécules formées dans les jours suivants.

Les prélèvements de ces lapins ont été pratiqués à des temps variables, de trois jours à douze jours, après l'injection du ^{59}Fe . Nous n'avons pas tiré de résultat interprétable des expériences effectuées à des temps plus longs où toutes les fractions ont une activité spécifique égale. Mais, quand on réduit la durée d'incorporation de ^{59}Fe à quelques heures, en commençant 12 heures plus tard les injections de fer non radioactif, on constate que la fraction A_4 n'a d'activité spécifique supérieure à celle de l'hémoglobine principale que pendant une durée de moins de trois jours. En effet, si le prélèvement est fait postérieurement à cette date, on n'observe plus de différence entre les activités spécifiques des deux fractions, alors que sans dilution cette différence se prolonge 5 à 6 jours.

2°) *Expérience de conservation des globules rouges « in vitro ».*

Dans l'hypothèse où la fraction A_4 serait un précurseur de l'hémoglobine principale A_1 on pourrait supposer que la transformation de l'une dans l'autre s'opèrerait sur des globules rouges conservés en dehors de l'organisme.

Un lapin ayant reçu une injection de ^{59}Fe est saigné à la 40^e heure. Le sang est prélevé stérilement par ponction cardiaque. Une partie du prélèvement a servi à la préparation immédiate d'une solution d'hémoglobine qui a été fractionnée par chromatographie. L'autre partie a été conservée stérilement sur solution d'A.C.D. (acide citrique-citrate-glucose), telle qu'elle est utilisée en transfusion sanguine, pendant 12 jours à 4°. L'hémoglobine a été préparée à ce moment et fractionnée sur colonne d'Amberlite IRC 50.

On en constate aucune différence entre les deux chromatographies, la courbe des activités spécifiques s'élève au moment de l'éluion de A_4 sur l'hémoglobine préparée à partir de sang conservé comme sur l'hémoglobine préparée immédiatement.

3°) *Expériences de fractionnement des globules rouges selon leur âge.*

Par des fractionnements de globules rouges selon leur âge, nous avons cherché si la fraction d'éluion lente et de haute activité spécifique précoce était localisée uniquement dans certains globules rouges jeunes ou si elle était répartie dans toute la population de globules rouges (11) (20).

Deux types de fractionnements ont été faits :

a) par hémolyses fractionnées par des solutions de molarité décroissante de chlorure de sodium;

b) par centrifugations différentielles en sérum-albumine de bœuf à 30 %, selon la technique de PRANKERD (75) qui a été décrite au chapitre II.

La plupart de ces fractionnements ayant été effectués 24 ou 48 heures après le marquage *in vivo* de l'animal, nous avons jugé de leur qualité en comparant l'activité spécifique des hémolysats obtenus à partir des différentes fractions, antérieurement à toute chromatographie. Nous

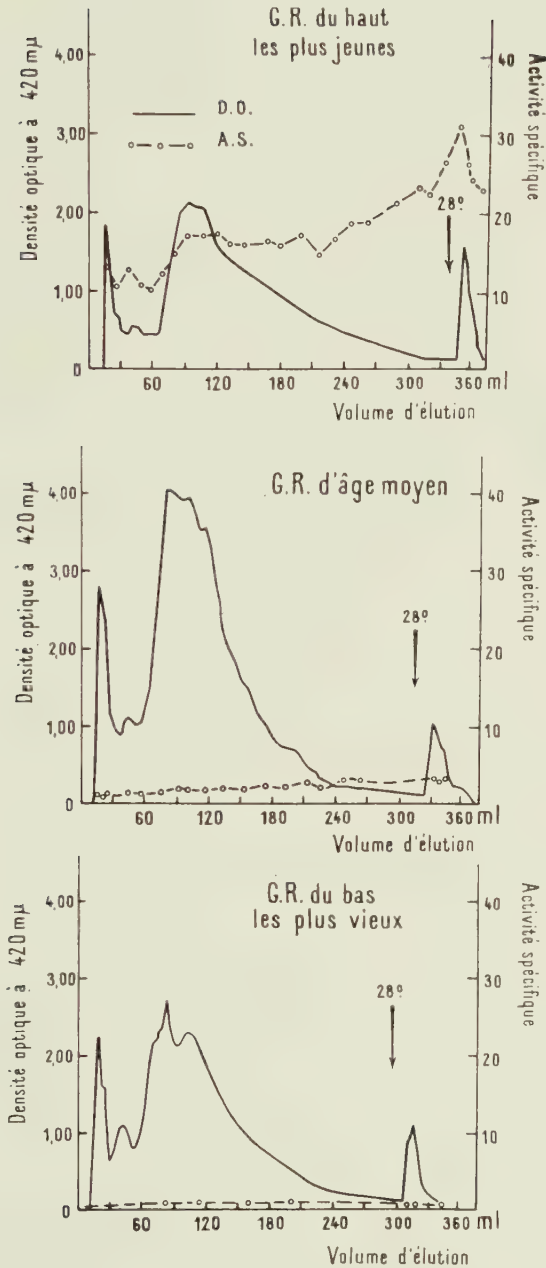


FIG. 9. — Activités spécifiques comparées des différentes fractions sur des populations de globules rouges séparées par centrifugations différentielles en sérumbumine de bœuf à 30 % (Technique de Prankerdt). Prélèvement fait à la 40^e heure.

n'avons obtenu par hémolyses que des fractionnements partiels, le rapport des activités spécifiques de la fraction la plus marquée à la fraction la moins marquée étant de 7 à 1. Par centrifugations différentielles, par contre, les fractionnements ont été apparemment bien meilleurs, le rapport de l'activité spécifique des globules rouges les plus légers, ou les plus jeunes, aux globules rouges les plus denses, ou les plus vieux, étant d'environ 100 à 1.

Si des chromatographies sont faites dans des conditions identiques sur ces différentes fractions, on obtient des résultats suivants (fig. 9) :

a) le fractionnement chromatographique, tel que nous l'avons standardisé, nous a montré qu'une fraction A_1 existe dans toutes les populations de globules rouges. Tout au plus pourrait-on dire qu'il y en a un peu plus dans les globules rouges les plus jeunes que dans les globules rouges les plus vieux (6 % au lieu de 4 %);

b) ces fractions A_1 n'ont pas la même activité spécifique dans les différentes fractions, la fraction A_1 des globules rouges vieux étant beaucoup moins marquée que celle des globules rouges jeunes;

c) le rapport des activités spécifiques des fractions A_4 et A_1

$$\frac{\text{activité spécifique } A_4}{\text{activité spécifique } A_1}$$

est sensiblement constant dans toutes les fractions et égal à 2, ceci aussi bien quand le fractionnement a été effectué par hémolyses que par centrifugations.

Aucun de ces deux moyens de fractionnement ne nous a donc permis d'isoler une population de globules rouges dans laquelle serait localisée la fraction A_1 , et rien ne nous permet d'affirmer que cette population existe.

Un fractionnement par contre a été effectué par centrifugations différentielles à un temps tardif 37^e jour après l'injection à l'animal du ^{59}Fe . Le rapport des activités spécifiques des hémolysats obtenus à partir des cellules les plus denses, ou les plus vieilles, et les plus légères, ou les plus jeunes, n'était que de 2 à 1.

Les chromatographies faites dans des conditions identiques sur ces deux fractions ont donné les résultats suivants :

a) la fraction A_4 a été retrouvée dans les deux populations de globules rouges, un peu plus abondante dans les plus jeunes que dans les plus vieux (8 % au lieu de 6 %);

b) le rapport des activités spécifiques des fractions A_4 et A_1

$$\frac{\text{A.S. de } A_4}{\text{A.S. de } A_1}$$

était le même dans les deux populations, la baisse ayant été de 15 % dans les deux cas (tableau V).

	A.S. moyenne de la fraction A_1	A.S. moyenne de la fraction A_4
Globules rouges les plus légers	2,13	1,82
Globules rouges les plus denses	4,21	3,64

TABLEAU V. — *Activités spécifiques comparées des fractions A_1 et A_4 de populations de globules rouges séparés par centrifugations différentielles en sérumalbumine de bœuf à 30 % (Technique de PRANKERD). Prélèvement au 37^e jour.*

Dans aucun des groupes n'est mise en évidence l'existence d'une population de globules rouges à durée de vie courte, et « turnover » rapide réutilisant préférentiellement le fer radioactif libéré, ce qui aurait entraîné une modification du rapport des activités spécifiques de A_1 et de A_4 .

Ces résultats témoignent d'un fractionnement peu efficace : il ne permet d'isoler que des globules rouges très jeunes. La fraction la plus légère contient incontestablement les globules rouges les plus jeunes, mais elle en contient également d'autre, ainsi qu'en témoigne sa radioactivité encore élevée 37 jours après l'injection de l'isotope radioactif.

CHAPITRE VII

ETUDE DE L'HETEROGENEITE METABOLIQUE DE L'HÉMOGLOBINE CHEZ LES LAPINS ANÉMIÉS

Nous avons cherché si l'utilisation de lapins anémiés soit par saignées soit par injection de phénylhydrazine nous permettait, en modifiant la cinétique de la formation des globules rouges, de donner une interprétation métabolique de l'hétérogénéité de l'hémoglobine.

I. - ANIMAL ANÉMIÉ PAR SAIGNÉES

Un lapin a subi deux saignées de 35 ml chacune à 48 heures d'intervalle. La réticulocytose contrôlée à ce moment était d'environ 10 %. Il reçoit 50 microcuries de ^{59}Fe et subit un prélèvement 20 heures après. L'activité spécifique globale de l'hémoglobine est plus élevée qu'elle ne le serait chez un lapin normal. Le fractionnement sur Amberlite IRC 50 permet d'obtenir des fractions A_1 et A_4 dont le rapport d'activité spécifique est le même que chez le lapin normal, bien que la valeur absolue de la radioactivité soit 2 à 3 fois plus élevée que chez le lapin non anémié, pour chacun des fractions (figure 10).

II. - ANIMAUX ANÉMIÉS PAR INJECTION DE PHÉNYLHYDRAZINE

Cinq lapins ont été anémiés par cinq injections quotidiennes de 0,4 ml par kilog d'une solution de chlorhydrate de phénylhydrazine neutralisée à 2 %. La proportion de réticulocytes est d'environ 90 %. Les prélèvements ont été faits dans un délai de 16 à 28 heures après l'injection de ^{59}Fe .

L'hémoglobine préparée à partir de ces prélèvements est fractionnée par chromatographie sur Amberlite IRC 50. La courbe des activités spécifiques des différentes fractions diffère sensiblement de celle que l'on observe avec l'hémoglobine d'un animal normal. L'hémoglobine est très marquée dans son ensemble, mais, après l'élution d'une fraction rapide A_3 , moins marquée, on constate une brusque augmentation de l'activité spécifique au moment de l'élution de la fraction principale A_1 . L'activité spécifique reste ensuite sensiblement constante au moment de l'élution de la fraction lente A_4 plus abondante que chez le lapin normal (env. 10 %). Jamais on ne retrouve de façon nette d'augmentation importante de l'activité spécifique à ce moment (figure 11).

Pour expliquer cette discordance, nous avons envisagé deux hypothèses :

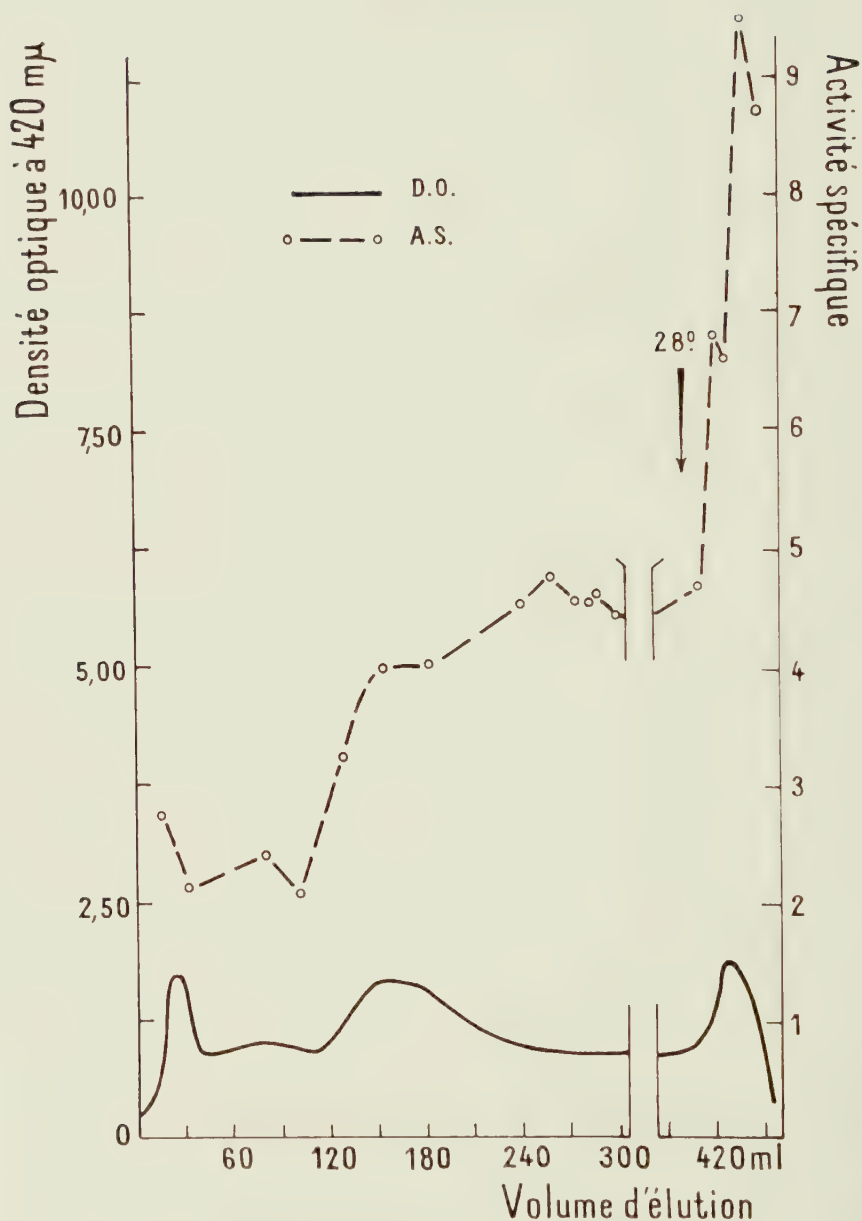


FIG. 10. — Activités spécifiques des différentes fractions chromatographiques de l'hémoglobine chez un lapin anémié par deux saignées de 35 ml. (Prélèvement fait 20 heures après l'injection de ^{59}Fe).

1° Dans une première hypothèse, nous pouvons penser que la constance de l'activité spécifique traduit l'existence d'un seul type d'hémoglobine. Ainsi cette hémoglobine pourrait être en totalité de

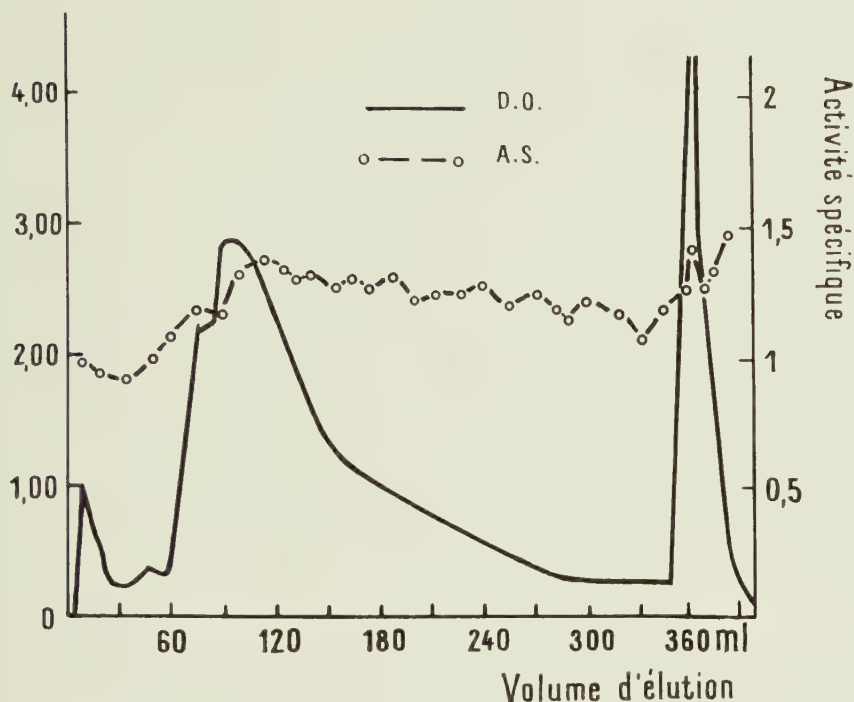


FIG. 11. — Activités spécifiques des différentes fractions chromatographiques de l'hémoglobine chez un lapin anémié par cinq injections de phénylhydrazine. (Prélèvement fait 16 heures après l'injection de ^{59}Fe).

type A_4 du fait de l'activation importante de la biosynthèse. Cette hémoglobine s'éluerait anormalement du fait de la surcharge relative de la colonne en cette fraction.

2°) Dans une deuxième hypothèse la fraction A_1 et la fraction A_4 seraient, comme chez l'animal normal, deux hémoglobines différentes. La différence serait masquée par l'égalité des activités spécifiques due à une synthèse beaucoup plus rapide que chez l'animal normal de la fraction A_1 et sa dilution bien moindre par les hématies non marquées synthétisées avant le marquage.

Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous avons fait deux séries d'expériences en employant la méthode de dilution isotopique :

1°) Nous avons mélangé de l'hémoglobine réticulocytaire totale marquée, avec de l'hémoglobine de lapin normal non radioactif, ceci dans des proportions variables, et nous avons fractionné les mélanges sur Amberlite IRC 50.

Si l'on avait affaire, selon la première hypothèse, à une hémoglobine unique du type A_4 , on devrait faire apparaître des différences d'Activité Spécifique, par chromatographie du mélange, l'hémoglobine d'origine

réticulocytaire s'éluant entièrement avec la fraction A_1 de l'hémoglobine d'origine adulte. Si on a en réalité deux hémoglobines, selon la deuxième hypothèse, la dilution isotopique identique des 2 fractions entraînera une Activité Spécifique sensiblement constante dans l'ensemble des fractions A_1 et A_4 .

Nous constatons que les différences d'Activité Spécifique de A_1 et A_4 ne sont pas significatives. Donc les fractions A_1 et A_4 existent toutes deux dans l'hémoglobine réticulocytaire, mais elles sont marquées identiquement (tableau VI).

NATURE ET PROPORTIONS DU MÉLANGE	ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES		
	A_3	A_1	A_4
Lapin normal marqué 1 part	0,9 à 1	0,9	0,9
Lapin réticulocytaire non marqué. 1 —			
Lapin normal non marqué 1 part	1,5	2	2,2
Lapin réticulocytaire marqué 1 —			
Lapin normal non marqué 1 part	0,5	0,9	1 à 1,2
Lapin réticulocytaire marqué 4 —			
Lapin normal non marqué 4 parts	2,5	4	4 à 5
Lapin réticulocytaire marqué 1 —			

TABLEAU VI. — *Activités spécifiques comparées des différentes fractions après chromatographie de mélanges de lapin normal et réticulocytaire, l'un des deux, seul, étant marqué.*

2° Ceci est confirmé plus directement par l'expérience suivante :

Un lapin réticulocytaire a été marqué *in vivo* au ^{59}Fe . Le prélèvement fait à la 28^e heure nous a permis d'obtenir une hémoglobine très radioactive. Après fractionnement chromatographique nous avons concentré séparément la fraction A_1 et la fraction A_4 (en évitant de garder la zone intermédiaire douteuse. Ces deux fractions étaient d'Activité Spécifique sensiblement égale (12 à 14). Nous avons fait deux mélanges : l'un comportant 1/5 de fraction A_1 radioactive de lapin réticulocytaire et 4/5 d'hémoglobine de lapin normal non radioactif. L'autre mélange comprend dans les mêmes proportions de l'hémoglobine A_4 radioactive du même lapin réticulocytaire et l'hémoglobine de lapin normal. Ces deux mélanges ont été comparativement à nouveau fractionnées par chromatographie (figure 12).

Avec le premier mélange on obtient des Activités Spécifiques progressivement décroissantes entre 7 au début de A_1 jusqu'à 3 pour la fraction A_1 .

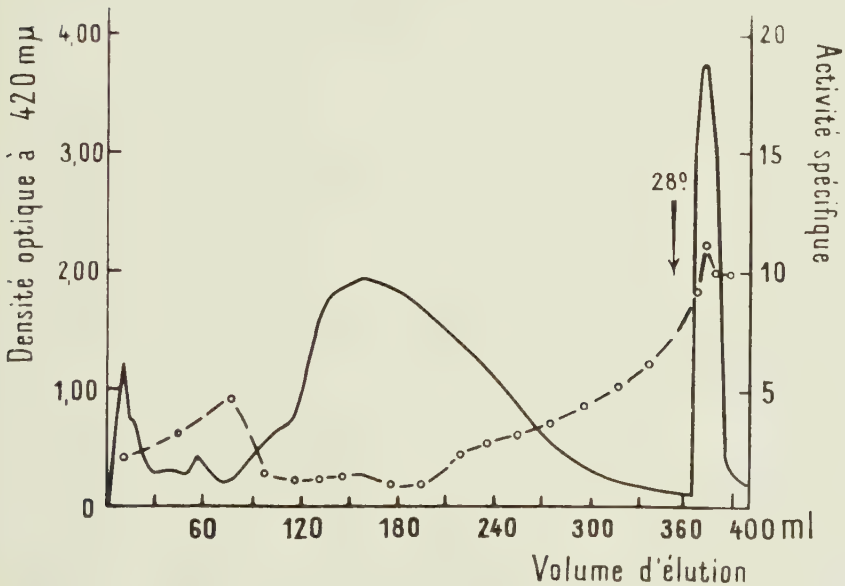
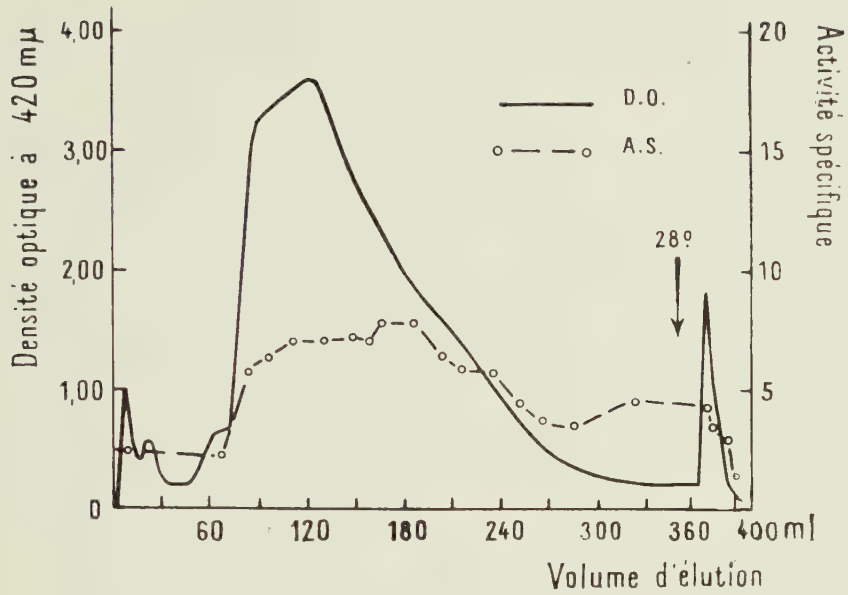


FIG. 12. — Variation des Activités Spécifiques des différentes fractions au cours des chromatographies comparées de 2 mélanges :

— En haut :	Fraction A ₁ de lapin réticulocytaire	15 mg
	Hémoglobine A totale de lapin normal	60 mg
— En bas :	Fraction A ₄ de lapin réticulocytaire	15 mg
	Hémoglobine totale de lapin normal	60 mg

Avec le deuxième mélange on obtient au contraire une augmentation progressive de l'Activité Spécifique de 1 à 10. De plus, la fraction A_4 est plus abondante qu'avec le premier mélange.

Les variations de sens inverse des Activités Spécifiques au cours des deux chromatographies ainsi que les différences de proportions relatives des deux fractions montrent indiscutablement que le lapin réticulocytaire contient bien les deux types d'hémoglobine. Le fractionnement n'étant pas parfait, il reste une certaine quantité d'hémoglobine radioactive dans la fraction qui ne doit pas en contenir.

Ces résultats, en particulier le fait que l'hémoglobine A_1 et A_4 sont synthétisées à la même vitesse chez le lapin réticulocytaire seraient en faveur de l'existence de deux populations de globules rouges avec chacune un type d'hémoglobine différent. Cependant, on ne peut exclure la possibilité que l'hémoglobine A_4 , si elle n'est pas le précurseur obligatoire de la biosynthèse de A_1 , quand celle-ci est synthétisée en grande quantité, soit cependant ultérieurement transformée en A_1 dans d'autres conditions physiologiques.

CHAPITRE VIII

FRACTIONNEMENTS APRÈS SYNTHÈSE D'HÉMOGLOBINE *IN VITRO*

Le problème de la signification des globules rouges contenant la fraction A_4 n'ayant pu être résolu après marquage des animaux *in vivo*, nous avons cherché à savoir si des expériences d'incorporation *in vitro* pourraient nous apporter des renseignements complémentaires. Ces incorporations ont été faites en système cellulaire et en système acellulaire.

I. — FRACTIONNEMENT DES HÉMOGLOBINES APRÈS INCORPORATION DE ^{59}Fe PAR UN SYSTÈME CELLULAIRE

Les réticulocytes, dans certaines conditions de pH, de température, de concentration ionique, et en présence d'une certaine proportion d'acides aminés et de Fer sont capables de synthétiser de l'hémoglobine (59) (9) (48) (10). Nous avons cherché le comportement chromatographique de l'hémoglobine ainsi synthétisée.

a) *Activité spécifique des fractions isolées en fonction du temps d'incubation.*

Les incubations ont été faites selon la technique de Borsook et coll. (9) (10) (48) modifiée. La durée de ces incubations a varié de 10 minutes à 240 minutes. Après l'incubation, l'hémoglobine a été préparée par relargage par des solutions de phosphates 3,5 M, et fractionnée sur Amberlite IRC 50.

Si l'on observe l'activité spécifique des fractions obtenues au cours de chaque fractionnement, en fonction de la durée de l'incubation, on constate que l'hémoglobine est d'autant plus marquée que l'incubation a été plus longue. Pour chaque chromatographie, on constate que l'activité spécifique de la fraction A_3 d'élution rapide est assez voisine de celle de la fraction A_1 , principale. La courbe de l'activité spécifique s'élève vers la fin de l'élution. Au moment du réchauffement, l'activité spécifique de la fraction A_4 est environ double de celle du début de la fraction A_1 . Il n'y a pas, comme après injection *in vivo* et prélèvement précoce, d'élévation brusque de l'activité spécifique au moment du réchauffement et de l'élution de A_4 (figure 13).

Dans tous les cas, et même quand l'incubation a été très courte, la fraction A_1 est déjà marquée dans son ensemble. Le rapport des activités spécifiques de la fraction A_4 et de la fraction A_1 est aussi sensiblement constant, quelle qu'ait été la durée de l'incubation.

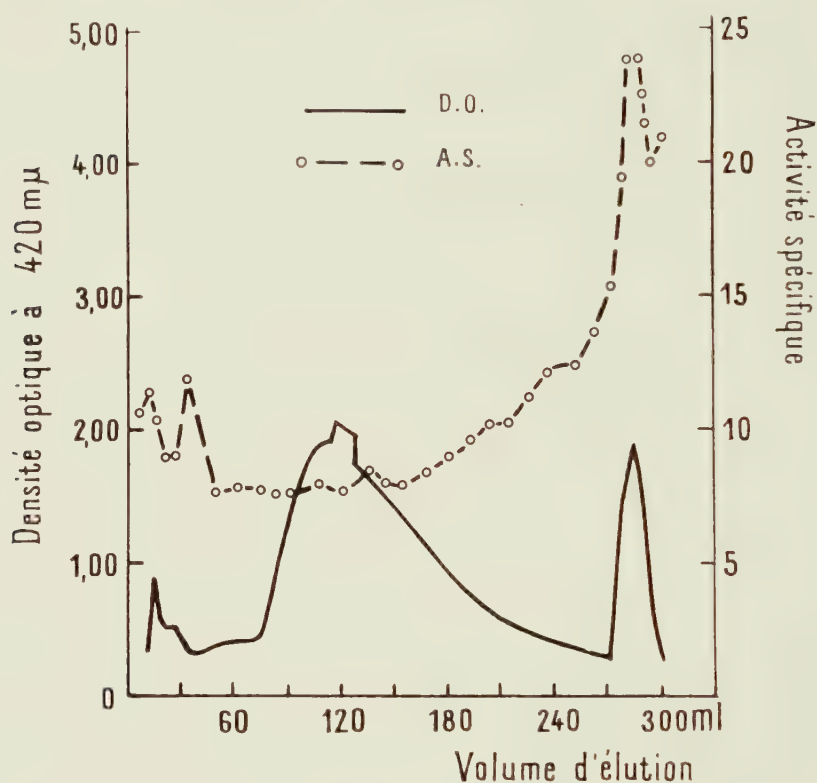


FIG. 13. — Courbe d'élution chromatographique et activités spécifiques des différentes fractions d'une hémoglobine préparée après incorporation *in vitro* de ^{59}Fe par un sang réticulocytaire de lapin.

Nous avons schématisé sur la figure 14 les activités spécifiques de la fraction A_1 et de la fraction A_4 en fonction de cette durée d'incubation.

On peut constater la constance du rapport $\frac{A.S. A_4}{A.D. A_1}$. Des résultats analogues ont été retrouvés dans trois séries d'expériences.

b) *Expériences de « chasse » par du Fer non radioactif après incorporation du ^{59}Fe .*

Le fractionnement par chromatographie des hémoglobines marquées *in vitro* donne des résultats analogues à ceux qu'on observe après marquage *in vivo*.

Nous avons recherché si la fraction précocement marquée après l'incubation en présence de ^{59}Fe pouvait être considérée comme un intermédiaire dans la formation de l'hémoglobine, ou si elle se formait parallèlement à l'hémoglobine principale et de façon indépendante. S'il s'agit, en effet, d'un intermédiaire à courte durée de vie, son activité spécifique plus élevée à la suite de l'incubation en présence d'un précurseur radioactif devrait s'abaisser au cours d'une expérience de « chasse » quand on prolonge l'incubation en présence du même précurseur non radioactif mis en excès. La radioactivité de la fraction intermédiaire devrait s'abaisser dans ces conditions alors que celle de la fraction principale devrait augmenter d'une radioactivité équivalente, traduisant ainsi la transformation de précurseur en hémoglobine principale.

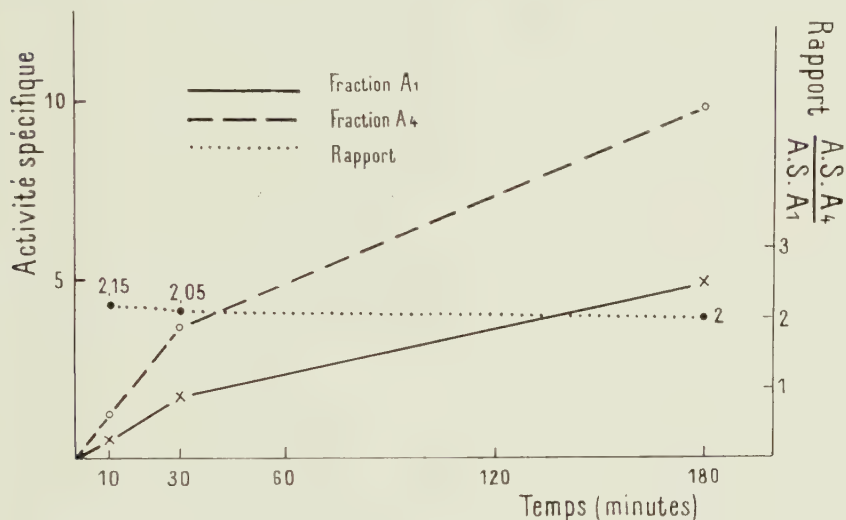


FIG. 14. — Expériences d'incorporation *in vitro* de ^{59}Fe par des réticulocytes de lapin.

Courbe schématique comparée de l'incorporation du précurseur par les fractions A_1 et A_4 en fonction du temps d'incubation.

Nous avons vu que GREENOUGH, PETERS et THOMAS ont ainsi décrit dans les cellules de la moelle osseuse un précurseur ferroprotéique de l'hémoglobine (27).

LINGREL et BORSOOK ont également décrit, après incubation de réticulocytes de lapin en présence de leucine ^{14}C , une fraction mineure qu'ils considèrent comme un intermédiaire possible dans la synthèse de l'hémoglobine (57) (58). Cette fraction, plus anodique à l'électrophorèse, d'éluion plus rapide que la fraction principale par chromatographie sur Amberlite, présente une activité spécifique plus élevée que celle de la fraction principale après l'incubation, mais cette activité spécifique diminue au cours de l'expérience de « chasse » jusqu'à être égale au bout de 120 minutes. En fait, cette fraction pourrait être non un précurseur se transformant ultérieurement en l'hémoglobine principale, mais

une hémoglobine qui, au moment de sa formation, serait associée avec un autre composé modifiant sa charge et donc son comportement électrophorétique. Ultérieurement, il pourrait se produire une équilibration entre l'hémoglobine principale et l'hémoglobine associée à l'autre composant, ce qui expliquerait l'égalité de leurs activités spécifiques.

Nous avons cherché si, dans le cas de la fraction A_4 aussi, la « chasse » par du Fer non radioactif modifierait le rapport des activités spécifiques et nous permettrait de considérer cette fraction comme un intermédiaire dans la formation de A_1 .

Après une incubation de 10 minutes en présence de ^{59}Fe les globules rouges sont divisés en 4 lots. Sur l'un d'entre eux on prépare directement l'hémoglobine. Les trois autres sont lavés par la solution de

	FRACTION INCUBÉE	ÉPREUVE DE « CHASSE » PAR FER NON RADIOACTIF		
	10 minutes	10 minutes	60 minutes	240 min.
A.S. A_4	11	12	11,5	12
A.D. A_1	5	6	6	6,5
Rapport $\frac{\text{A.S. } A_4}{\text{A.D. } A_1}$	2,2	2	1,95	1,85

TABLEAU VII. — *Activités spécifiques comparées des différentes fractions chromatographiques après incorporation in vitro de ^{59}Fe et épreuves de « chasse » de durées différentes.*

Krebs-Henseleit à froid puis remis à incuber dans les mêmes conditions que précédemment, mais en remplaçant la solution de ^{59}Fe par une solution de Fer non radioactif de manière à avoir 2 mg de Fer pour 10 ml de culot globulaire. Ces « chasses » sont réalisées pendant les temps suivants : 10 minutes — 60 minutes et 240 minutes. Les hémoglobines sont préparées à partir des trois culots globulaires. On fait simultanément la chromatographie des trois échantillons et celle du témoin qui a été préparé après la première incubation. Si l'on compare les résultats de ces quatre chromatographies on constate qu'il n'y a aucune différence entre elles. L'incubation en présence de Fer non radioactif n'a pas modifié le rapport des activités spécifiques des différentes fractions. Il n'y a pas eu de transformation de A_4 en A_1 ni d'équilibration entre les deux fractions, la baisse du rapport des activités spécifiques n'étant pas significative (tableau VII).

II. — FRACTIONNEMENT DES HÉMOGLOBINES APRÈS INCORPORATION DE VALINE ^{14}C PAR UN SYSTÈME ACELLULAIRE DE RÉTICULOCYTES

Trois expériences ont été faites selon la technique de SCHWEET (89) modifiée par KRUH (49) telle qu'elle a été décrite au chapitre II. Les incubations ont été faites en présence de la même quantité de Valine ^{14}C (1 microcurie dans 1 microgramme). Les résultats sont résumés dans le tableau :

	HÉMOGLOBINE C.M./MG		
	1 ^{re} expérience	2 ^e expérience	3 ^e expérience
A.S. fraction A_3	243	880	2100
A.S. fraction A_1	9	106	120
A.S. fraction A_4	22	220	216

TABLEAU VIII. — *Activités spécifiques des différentes fractions chromatographiques après incorporation de Valine ^{14}C par un système acellulaire de réticulocytes.*

On constate que, dans tous les cas, la fraction A_3 est de loin la plus marquée. Elle correspond donc à la protéine la plus activement synthétisée dans ce système. Cependant les hémoglobines de ces expériences n'ont pas été purifiées par relargage en phosphate 3,5 M, mais seulement par ultracentrifugation à 105.000 g. On sait par ailleurs qu'au cours de la chromatographie des hémoglobines sur Amberlite IRC 50 les fractions d'élution rapide contiennent aussi des protéines non hémoglobiniques. Aucun critère de pureté hémoglobinique n'a été appliqué à ces fractions qui ne faisaient pas l'objet de notre travail.

Le rapport des activités spécifiques de A_4 et de A_1 est voisin de 2 comme dans les expériences d'incubation effectuée avec les réticulocytes entiers. Nous trouvons donc, au cours de synthèses acellulaires, des résultats comparables à ceux que nous observons avec des réticulocytes entiers.

CHAPITRE IX

HETEROGENEITE METABOLIQUE DE L'HÉMOGLOBINE HUMAINE

Nous avons recherché si l'hétérogénéité métabolique constatée avec l'hémoglobine de lapin se retrouvait avec l'hémoglobine humaine.

SCHROEDER (2) (15) (88) a mis en évidence l'existence de fractions mineures d'élution rapide dans l'hémoglobine humaine. Lorsque nous appliquons à l'hémoglobine humaine la technique utilisée avec l'hémoglobine de lapin, mais avec un tampon plus acide et de molarité en sodium plus faible (0,050 M en Na^+ , 0,01 M en KCN, pH $7,02 \pm 0,02$), nous obtenons une courbe d'élution tout à fait comparable à celle obtenue avec l'hémoglobine de lapin.

Cette étude a pu être faite, comme chez le lapin, après marquage *in vivo* et *in vitro*, bien qu'avec des taux de marquage très inférieurs.

1° Fractionnement d'hémoglobines humaines marquées *in vivo*.

Nous avons pu examiner les hémoglobines de trois malades qui avaient reçu trois ou quatre jours auparavant une injection de $20 \mu\text{c}$ de ^{59}Fe dans un but diagnostic. (Deux de ces malades étaient atteints d'hémochromatose, la troisième présentait une anémie hypochrome.)

Nous avons été amenés à certaines modifications de la technique employée pour les hémoglobines de lapin. Les hémoglobines humaines sont préparées à partir d'un hémolysat par purification au toluène puis centrifugation de 60 minutes à 20.000 G. La chromatographie est comparable, quoique avec un tampon différent.

	EXPÉRIENCE 1	EXPÉRIENCE 2	EXPÉRIENCE 3
A.S. Fraction A_1	3,32 c.m/mg	2,9 c.m/mg	4,65
A.S. Fraction A_4	7,17 c.m/mg	4,1 c.m/mg	7,2 c.m/mg

TABLEAU IX. — Activités spécifiques comparées des différentes fractions chromatographiques de l'hémoglobine humaine chez des malades ayant reçu une injection de ^{59}Fe .

Enfin l'hémoglobine étant beaucoup moins marquée il est impossible de déterminer l'Activité Spécifique tube par tube. On réunit d'une part l'ensemble des tubes correspondant à la fraction A_1 , d'autre part ceux qui correspondent à la fraction A_4 . Ces fractions sont concentrées et transformées en Cyanmethémoglobine, séparées de la fraction A_2 par Electrophorèse sur bloc d'amidon. La détermination de l'Activité Spécifique est faite sur la totalité des fractions concentrées.

Comme dans l'hémoglobine de lapin, l'Activité Spécifique de la fraction A_4 est nettement plus élevée que celle de la fraction A_1 , la variation du rapport $\frac{A.S. A_4}{A.S. A_1}$ devant être attribuée au délai variable qui a séparé l'injection de ^{59}Fe et le prélèvement.

2° Fractionnement d'une hémoglobine humaine marquée *in vitro*.

Nous avons utilisé pour cette étude le sang d'un enfant présentant une réticulocytose de 30 %. L'incubation a été faite comme celle des sangs de lapins réticulocytaires, puis l'hémoglobine préparée par purification au toluène et suivie d'une centrifugation de 60 minutes à 20.000 g. et fractionnée par chromatographie.

On constate que l'hémoglobine A_1 a une Activité Spécifique comprise entre 1,62 et 2,18 selon les tubes, alors que l'hémoglobine A_4 a une Activité Spécifique allant de 3,72 à 4,6. Le rapport des Activités Spécifiques est légèrement supérieur à 2. Le résultat est voisin de celui obtenu avec l'hémoglobine de lapin.

Ceci est en accord avec les résultats décrits par SCHAPIRA, DREYFUS et KRUH (83).

CHAPITRE X

DISCUSSION

L'hétérogénéité de l'hémoglobine de lapin adulte a été établie par SCHAPIRA, DREYFUS, KRUIH et coll. en 1951 en combinant diverses techniques de fractionnement et le marquage préalable par incorporation biologique d'un précurseur radioactif. La mise en évidence d'une hétérogénéité signifie à la fois qu'il y a au moins deux hémoglobines différentes, et que ces hémoglobines présentent des métabolismes différents.

Dans ce travail, en utilisant des méthodes de fractionnement plus efficaces, résines échangeuses d'ions, nous avons pu isoler, une fraction d'hémoglobine que nous avons proposé d'appeler Hémoglobine A_4 et qui se définit par les caractéristiques suivantes :

1° Cette fraction est définie par son comportement chromatographique. Sur Amberlite IRC 50 l'élution sépare successivement une fraction mineure correspondant à l'hémoglobine A_3 , puis un pic principal d'hémoglobine A_1 , enfin après réchauffement de la colonne de chromatographie la fraction A_4 . L'individualité chromatographique de cette fraction a été prouvée.

2° Cette fraction se définit aussi par son métabolisme particulier. Après incorporation de ^{59}Fe ou de Glycine ^{14}C elle est dès les premières heures deux fois plus marquée environ que la fraction A_1 . Son Activité Spécifique varie ensuite en fonction du temps : plus élevée au début que celle de la fraction A_1 , elle lui est ensuite égale et finalement plus basse.

3° Tous les critères de pureté appliqués à cette fraction ont prouvé qu'il s'agit bien d'hémoglobine.

Aucune différence de structure primaire n'a pu être mise en évidence entre cette hémoglobine A_4 et l'hémoglobine A_1 .

Aucune population de globules rouges à laquelle elle appartiendrait, n'a pu être isolée.

4° Les mêmes différences de biosynthèse entre A_4 et A_1 ont été retrouvées *in vitro* tant après incorporation de ^{59}Fe par des réticulocytes de lapin qu'après incorporation de Valine ^{14}C par un système acellulaire de réticulocytes.

5° Ces observations faites chez le lapin, ont été reproduites lors des fractionnements de l'hémoglobine humaine, aussi bien après marquage *in vivo* qu'après incorporation *in vitro*.

L'existence de l'hétérogénéité de l'hémoglobine pose le problème de la dépendance génétique des différents types d'hémoglobine simultanément présents chez le même individu.

On connaît chez l'homme, nous l'avons rappelé au début de ce travail, plusieurs hémoglobines qui peuvent exister simultanément. On connaît l'existence de plusieurs *loci* génétiques commandant la synthèse de plusieurs chaînes polypeptidiques différentes, les chaînes α , β , γ et δ qui se sont différenciées, au cours de l'évolution, à partir de la chaîne α .

Il est remarquable de voir que toutes les hémoglobines normales, même génétiquement déterminées, comportent une chaîne fixe, la chaîne α , qui se combine ontogénétiquement, d'abord à la chaîne γ , puis à la chaîne β , enfin à la chaîne δ (celle-ci dérivant phylogénétiquement de la chaîne β), formant successivement l'hémoglobine fœtale, l'hémoglobine A_1 et l'hémoglobine A_2 (40) (69) (71).

Au cours de l'évolution, ces mutations se sont faites à des dates que l'on peut fixer, à quelques centaines de millions d'années pour la mutation γ - β , à quelques dizaines de millions d'années pour la mutation β - δ . La chaîne δ et l'hémoglobine A_2 n'existe que chez l'homme et quelques anthropoïdes, elle n'existe pas chez les autres espèces, en particulier chez le lapin.

Jusqu'à présent, toutes les hémoglobines anormales comportent une mutation portant sur un seul acide aminé d'une chaîne de la globine et sont déterminées par une modification du gène de structure (4) (39). Dans les thalassémies, il y a un trouble de contrôle de la biosynthèse avec formation inégale des deux chaînes (41).

Il n'est cependant pas possible de conclure de ces travaux que toutes les hémoglobines qui peuvent être individualisées sont génétiquement déterminées. Il a été établi que l'hémoglobine A_3 , aussi bien chez l'homme que chez le lapin, est un produit de vieillissement de l'hémoglobine principale qui réagit progressivement avec le glutathion et dont le comportement n'est pas en relation avec un contrôle génétique.

L'hémoglobine A_4 pose le problème de son individualité génétique, et c'est entre les deux hypothèses d'une hémoglobine génétiquement déterminée ou d'une hémoglobine qui soit une forme jeune de l'hémoglobine A_1 que va se situer notre discussion.

La synthèse de A_4 peut être contrôlée par un ou plusieurs gènes différents de ceux contrôlant la synthèse de l'hémoglobine principale. Dans l'état actuel de nos connaissances, ceci devrait se traduire par des différences portant sur la structure primaire de cette protéine. Une telle différence n'a pu être établie par l'utilisation de la méthode des « fingerprints », elle ne peut cependant être totalement exclue.

Dans l'éventualité d'une identité de la structure primaire nous sommes amenés à attribuer au contrôle des mêmes gènes la synthèse de l'hémoglobine A_1 et celle de l'hémoglobine A_4 .

La différence de comportement de l'hémoglobine A_4 doit dans ces conditions être expliquée soit par une différence de structure tertiaire

(une telle différence a été postulée par EDMUNDSON pour expliquer la multiplicité des fractions chromatographiques de myoglobine) (22), soit par une différence portant sur le groupement prosthétique, soit encore par une combinaison temporaire de l'hémoglobine avec une autre molécule. Les expériences destinées à tester ces deux dernières éventualités n'ont permis de mettre en évidence ni une modification de l'hème, ni une combinaison de l'hémoglobine. Cependant ces possibilités ne peuvent être éliminées avec certitude.

L'interprétation de la signification de l'hémoglobine A_4 doit tenir compte à la fois des anomalies de comportement chromatographique, liées à des différences de structure, et de l'incorporation différente des précurseurs, ^{59}Fe et Glycocolle ^{14}C . Le fait que ces deux précurseurs se comportent de manière identique et, dans le cas du glycocolle, que cette identité se retrouve dans l'hème et la globine, exclue l'existence de pools précurseurs différents pour les deux types d'hémoglobine.

Le comportement particulier peut s'expliquer de trois façons, la première étant peu probable.

1° Une cinétique différente de formation de l'hémoglobine dans la moëlle osseuse pourrait expliquer que l'hémoglobine A_4 se forme à un stade terminal de la maturation de l'érythroblaste, étant donné sa radio-activité extrêmement intense dans les temps précoces. (Mais ceci est rendu improbable par les résultats des expériences d'incubation *in vitro*.)

2° Une relation de précurseur à produit entre les hémoglobines A_4 et A_1 rend compte de nos résultats à condition que ce précurseur soit partiel et non obligatoire.

3° Une propriété particulière de l'hémoglobine A_4 soumise à un renouvellement moléculaire ou cellulaire très rapide.

Cette discussion se simplifie si on fait intervenir les résultats des expériences d'incorporation *in vitro* cellulaire et acellulaire.

Les résultats des expériences d'incorporation par des réticulocytes entiers font penser que la fraction A_4 n'est pas un précurseur à vie courte de la fraction A_1 . En effet, au cours d'une incubation même très courte, cette fraction A_1 est déjà marquée dans son ensemble. Elle est donc de synthèse rapide. Une expérience de « chasse » 24 fois plus longue que la première incubation n'amène aucune modification significative des rapports des activités spécifiques des deux fractions. Les deux fractions se synthétisent donc simultanément et à des vitesses différentes. On ne peut cependant exclure la possibilité que la fraction A_4 soit un précurseur dont la durée de vie serait un à deux jours et dont la qualité de précurseur ne pourrait être mise en évidence en quelques heures.

La synthèse de ces deux protéines pose de nouveau le problème du contrôle génétique. Si ces deux protéines diffèrent par leur structure primaire, on doit postuler l'existence de 2 A R N. messagers. susceptibles de se traduire en 2 protéines différents que l'on ait ou non 2 types de ribosomes. Les 2 hémoglobines sont en effet de structure suffisamment voisine pour les mêmes ribosomes portant un début de chaîne puissent

synthétiser l'une ou l'autre hémoglobine. Si ces deux hémoglobines se différencient par leur groupement prosthétique ou par leur combinaison avec une autre molécule, il suffit d'admettre la synthèse ribosomique d'un seul type de protéine.

L'activité spécifique plus élevée de l'hémoglobine A_1 peut se comprendre par une éventuelle relation de précurseur à produit. Une biosynthèse plus grande de l'hémoglobine A_4 en système acellulaire qu'*in vivo* est plus probable et, dans ce cas, la dilution isotopique de la protéine qui se forme est plus grande pour l'hémoglobine A_1 que pour l'hémoglobine A_4 .

La conjoncture de la radioactivité plus élevée dans tous les cas et du comportement physico-chimique différent de l'hémoglobine s'explique difficilement en dehors d'une synthèse qualitativement différente de l'hémoglobine A_4 .

CONCLUSIONS

En combinant le fractionnement chromatographique et le marquage biologique par des précurseurs radioactifs, nous avons démontré l'existence d'une nouvelle hémoglobine, que nous appelons hémoglobine A_1 .

1) Cette hémoglobine représente une entité chromatographique. Sur résine échangeuse de cations Amberlite IRC 50 elle est éluée plus tardivement que l'hémoglobine principale A_1 . Le comportement de ces fractions reste identique lors d'une deuxième chromatographie, ce qui permet d'affirmer leur individualité.

Après marquage *in vivo* par le ^{59}Fe ou le Glycocolle ^{14}C son métabolisme est différent de celui de l'hémoglobine A_1 . Son activité spécifique, plus élevée que celle de A_1 dans les premiers jours, témoignant d'une synthèse plus rapide, devient ensuite égale, puis inférieure.

2) Différentes expériences nous ont permis d'affirmer que cette fraction était bien de l'hémoglobine :

- électrophorèse en gel d'amidon à différents pH;
- détermination du spectre d'absorption;
- détermination du coefficient de sédimentation;
- différence de marquage des hémoglobines A_1 et A_1 retrouvée dans l'hémine cristallisée après marquage au ^{59}Fe , dans l'hémine et dans la globine après marquage au glycocolle ^{14}C ;
- différence de marquage retrouvée dans les hybrides interspécifiques formés par l'hémoglobine A_1 et l'hémoglobine A_1 de lapin, avec l'hémoglobine humaine.

3) Aucune différence de structure primaire n'a pu être mise en évidence entre les hémoglobines A_1 et A_1 par les méthodes que nous venons de citer, ni par la méthode des « fingerprints ».

4) Aucune expérience de fractionnement ne nous a permis d'isoler une population enrichie de façon importante en cette fraction.

Il n'y a pas de transformation *in vitro* de l'hémoglobine A_1 en hémoglobine A_1 .

5) Chez les lapins anémiés par une intoxication au chlorhydrate de phénylhydrazine, la fraction A_1 est apparemment aussi marquée que la fraction A_1 . Nous avons cependant pu mettre en évidence que les deux fractions existent. Il y a dans ce cas synthèse simultanée et à la même vitesse de deux hémoglobines différentes.

6) Les expériences de marquage *in vitro* nous ont permis de retrouver le même phénomène tant en système cellulaire qu'en système acellulaire. Après incorporation de ^{59}Fe par des réticulocytes de lapin, on observe entre la fraction A_1 et la fraction A_2 une différence d'Activité Spécifique analogue à celle qui existe après marquage *in vivo*. Cette différence n'est pas influencée par la durée de l'incubation.

La même différence est observée après incorporation de valine ^{14}C par un système acellulaire de réticulocytes de lapin.

7) Le fractionnement chromatographique d'hémoglobine humaine, après marquage *in vivo* ou *in vitro*, permet aussi d'individualiser une fraction lente d'activité spécifique plus élevée que la fraction principale.

8) L'existence de cette fraction de comportement biologique particulier, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, pose le problème de son individualité génétique ou au contraire de son caractère de précurseur dans la biosynthèse de l'hémoglobine normale.

Aucune expérience ne nous a permis d'établir ce caractère de précurseur.

On peut également éliminer une hémoglobine synthétisée dans la moelle osseuse à la fin de la vie de l'érythroblaste puisque la même hétérogénéité est retrouvée *in vitro* dans des systèmes dont la moelle est exclue.

Cette hétérogénéité se retrouvant après une incorporation en système acellulaire montre que le phénomène se situe au stade moléculaire. Bien qu'aucune différence de structure primaire n'ait pu être mise en évidence, l'ensemble de nos expériences est en faveur de deux hémoglobines génétiquement différentes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACHER (R.), COCKER (C.). — Specific colour reactions for arginine and tyrosine after chromatography. *Biochim. biophys. Acta*, 1952, 9, 704.
2. ALLEN (D.E.), SCHROEDER (W.A.) and BALOG (J.). — Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: A study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J. amer. chem. Soc.*, 1958, 80, 1628.
3. ANSON (M.L.) et MIRSKY (A.E.). — Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J. gen. Physiol.*, 1930, 13, 469.
4. BAGLIONI (C.). — Correlation between genetics and chemistry of human hemoglobins. In *Molecular Genetics*, part I p. 405 by Taylor (J.H.). N. Y. Academic Press.
5. BANGHAM (A.D.) et LEHMANN (H.). — « Multiple » haemoglobins in the horse. *Nature*, (1958, 181, 267).
6. BAGLIONI (C.). — An improved method for the fingerprinting of human hemoglobin. *Biochim. biophys. Acta*, 1961, 48, 292.
7. BALDRIDGE (R.C.), LEWIS (H.B.). — Diet and the ergothionine content of blood. *J. biol. Chem.*, 1953, 202, 169.
8. BOARDMAN (N.K.) et PARTRIDGE (S.M.). — Separation of neutral proteins on ion. Exchange resins. *Biochem. J.*, 1955, 59, 543.
9. BORSOOK (H.), DEASY (C.L.), HAAGEN-SMIT (A.S.), KEIGHLEY (G.) et LOWY (P.H.). — Incorporation *in vitro* of labeled amino acids into proteins of rabbit reticulocytes. *J. biol. Chem.*, 1952, 196, 669.
10. BORSOOK (H.), FISCHER (E.H.) et KEIGHLEY (G.). — Factors affecting protein synthesis *in vitro* in rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 1957, 229, 1059.
11. BORUN (E.R.), FIGUEROA (W.G.) et PERRY (S.M.). — The distribution of ⁵⁹Fe tagged human erythrocytes in centrifuged specimens as a function of cell age. *J. clin. Invest.*, 1957, 36, 676.
12. BRINKMAN (R.) et JONXIS (J.H.P.). — The occurrence of several kinds of haemoglobin in human blood. *J. Physiol.*, 1935, 85, 117.
13. BRINKMAN (R.) et JONXIS (J.H.P.). — Alkaline resistance and spreading velocity of foetal and adult types of mammalian haemoglobins. *J. Physiol.*, 1936, 88, 162.
14. BRINKMAN (R.), WILDSCHUT (A.) et WITTERMANS (A.). — The occurrence of two kinds of haemoglobin in human blood. *J. Physiol.*, 1934, 80, 377.
15. CLEGG (M.) et SCHROEDER (W.A.). — A chromatographic study of the minor components of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals. *J. amer. chem. Soc.*, 1959, 81, 6065.
16. CROSBY (W.H.), MUNN (J.), FURTH (F.W.). — *U.S. armed. Forces. med. J.*, 1954, 5, 693.
17. DONALDSON (R.), SISSON (R.B.), KING (E.J.), WOTTON et Mac FARLANE (R.G.). — Determination of haemoglobin VII Standardised optical data for absolute estimations. *Lancet*, 1951, 260, 874.
18. DRABKIN (D.L.). — A simplified technique for a large scale crystallization of human oxymoglobin isomorphous transformations of hemoglobin and myoglobin in the crystalline state. *Arch. Biochem.*, 1949, 21, 224.

19. DREYFUS (J.C.), KRUEH (J.), SCHAPIRA (G.). — Métabolismes comparés du groupement prosthétique et de la globine de l'hémoglobine. Les maladies du métabolisme des porphyrines. 2^e Cong. Intern. Saclay - P.U.F. 1962, Paris.
20. DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.), KRUEH (J.). — Fractionnement des hématies selon leur âge. Centrif d'hématies marquées par le fer radioactif. *C.R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 792.
21. DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.), KRUEH (J.). — Les phases initiales de l'hémoglobinoïdèse étudiées à l'aide de fer radioactif. *C.R. Soc. Biol.*, 1953, 147, 782.
22. EDMUNDSON (A.B.) et HIRS (C.H.W.). — On the structure of Sperm whale myoglobin I The amino acid composition and terminal groups of the chromatographically purified protein. *J. Molec. Biol.*, 1962, 5, 653.
23. FESSAS (Ph.), NASTROLAKOS (N.). — Demonstration of small components in red cell haemolysates by starch gel electrophoresis. *Nature*, 1979, 183, 1261.
24. FIELD (E.O.) et O'BRIEN (J.R.P.). — Dissociation of human haemoglobin at low pH. *Biochem. J.*, 1955, 60, 656.
25. GAMMACK (D.B.), HUEHNS (E.R.), SHOOTER (H.M.) et GERALD (P.S.) — Identification of the abnormal polypeptide chain of haemoglobin G. *J. Mol. Biol.*, 1960, 2, 372.
26. GRATZER (W.B.) et BEAVEN (G.H.). — The minor components of normal adult haemoglobin. *Brit. J. Haemat.*, 1960, 6, 1961.
27. GREENOUGH (W.B.), PETERS (T.), THOMAS (E.D.). — An intracellular Protein intermediate for hemoglobin formation. *J. clin. Invest.*
28. GROUCHY (J. de). — Utilisation d'un système tampon discontinu au cours de l'électrophorèse des hémoglobines à travers gel d'amidon. *Rev. franç. Et. clin. biol.*, 1958, 3, 877.
29. GUTTER (F.J.), PETERSON (E.A.), SOBER (H.A.). — Chromatography of proteins : human, horse and dog hemoglobins on cation exchange cellulose. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 80, 353.
30. HAUT (A.), TUDHOPE (G.R.), CARTWRIGHT (G.E.), WINTROBE. — The non hemoglobin erythrocytic proteins studied by electrophoresis on starch gel. *J. clin. Invest.*, 1962, 41, 579.
31. HIRS (C.M.W.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease. *J. biol. Chem.*, 1953, 200, 493.
32. HUEHNS (E.R.), SHOOTER (E.M.). — The polypeptide chains of haemoglobin A₂ and haemoglobin G₂. *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, 267.
33. HUENNEKENS (F.M.), COFFREY (R.W.), BOSFORD (R.E.) et GARRIO (B.N.). — Erythrocyte metabolism. IV Isolation and properties of methemoglobin reductase. *J. biol. Chem.*, 1957, 227, 261.
34. HUISMAN (T.H.J.), MARTIS (E.A.) et DOZY (A.). — Chromatography of hemoglobin types on carboxymethylcellulose. *J. lab. clin. Med.*, 1955, 52, 312.
35. HUISMAN (T.H.J.) et MEYER (C.A.). — Studies on the heterogeneity of hemoglobin I The heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in Amberlite IRC 50 chromatography = qualitative aspects. *Clin chim. Acta*, 1960, 5, 103.
36. HUISMAN (T.H.J.) et PRINS (H.K.). — Chromatographic estimation of four different human hemoglobins. *J. lab. clin. Med.*, 1955, 46, 255.
37. HUNT (J.A.) et INGRAM (V.M.). — Abnormal human hemoglobin. II the chymotryptic digestion of the trypsin resistant « core » of haemoglobins A and S. *Biochim. biophys. Acta.*, 1955, 25, 546.
38. INGRAM (V.M.). — Abnormal human haemoglobins I. The comparison of normal human and sickle haemoglobins by « fingerprinting ». *Biochim. biophys. Acta.*, 1958, 28, 539.

39. INGRAM (V.M.). — Hemoglobin and its abnormalities. *Charles Thomas Publisher* 1961, *Springfield Illinois*.
40. INGRAM (V.M.). — Gene evolution and the haemoglobins. *Nature*, 1961, 189, 704.
41. INGRAM (V.M.) et STRETTON (A.O.W.). — Genetic basis of the thalassaemic diseases. *Nature*, 1959, 184, 1903.
42. INGRAM (V.M.) et STRETTON (A.O.W.). — Human haemoglobin A₂ = chemistry, genetics and evolution. *Nature*, 1961, 190, 1079.
43. ITANO (H.A.) et SINGER (S.J.). — On dissociation and recombination of human adult hemoglobins A, S and C. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1958, 44, 522.
44. JEFSON (J.B.) et SMITH (I.). — « Multiple Dipping » Procedures in Paper Chromatography : a specific test for hydroxy-proline. *Nature*, 1953, 172, 1100.
45. JONXIS (J.H.P.). — Het voorkomen van meerdere haemoglobinen bij de mens. *Thesis, University of Groningen* (1935).
46. KOKBER (E.). — (1866) Thesis Dorpat. Über differenzen des Blutfarbstoffes.
47. KRÜH (J.). — Contribution à l'étude de la spécificité et du métabolisme de l'hémoglobine à l'aide de fer radioactif. *Thèse Sciences - Paris*, 1952.
48. KRÜH (J.) et BORSOOK (H.). — Hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes in vitro. *J. biol. Chem.*, 1956, 220, 905.
49. KRÜH (J.), ROSA (J.), DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.). — Synthèse d'hémoglobines par des systèmes acellulaires de réticulocytes. *Biochim. biophys. Acta.*, 1961, 49, 509.
50. KUNKEL (H.C.). — Zone electrophoresis in « Methods of biochemical analyses ». D. G. LL CK Ed. New York. *Intersciences*, 1953, I.I., 141.
51. KUNKEL (H.G.) et BEARN (A.G.). — Minor hemoglobin components of normal human blood. *Fed. Proc.*, 1957, 16, 760.
52. KUNKEL (H.G.), CEPPELLINI (R.), MÜLLER EBERHARD (V.), WOLF (J.). — Observations on the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individuals and patients with thalassemia.
53. KUNKEL (H.G.) et WALLENIUS (G.). — New hemoglobin in normal adult blood. *Science*, 1955, 122, 288.
54. LABBE (R.F.) et NISHIDA (G.). — A new method of hemin isolation. *Biochim. biophys. Acta.*, 1957, 26, 437.
55. LABIE (D.), ROSA (J.), DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.). — Interspecific hybridization of haemoglobin. *Nature*, 1962, 194, 384.
56. LAURENT (G.), CHARREL (M.), MARRICQ (C.), DERRIEN (Y.). — Sur les protéines accompagnant l'hémoglobine humaine dans ses préparations. I. Isolement et complexité de la « protéine non héminique d'Allen, Schroeder et Balog ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 196, 44, 619.
57. LINGREL (J.B.) et BORSOOK (H.). — Haemoglobin minors as possible intermediates in haemoglobin synthesis. *Nature*, 1962, 195, 355.
58. LINGREL (J.B.), BORSOOK (H.). — A comparison of Amino acid incorporation into the hemoglobin and ribosomes of marrow erythroid cells and circulating reticulocytes of severely anemic rabbits. *Biochemistry*, 1963, 2, 309.
59. LONDON (I.M.), SHEMIN (D.) et RITTENBERG (D.). — Synthesis of heme in vitro by the immature non nucleated mammalian erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 749.
60. LONDON (I.), WEST (R.), SHEMIN (D.), RITTENBERG (D.). — Origin of bile pigments in normal man. *J. biol. Chem.*, 1950, 184, 351.
61. MEYERING (C.A.), HUISMAN (T.H.J.). — Chromatographic investigations on the heterogeneity of normal adult haemoglobin. In protides of the biological fluids (Proc. 7th colloq. St Jans Hospital Bruges, 1959). *Elsevier Publ. co-Amsterdam*, 1960, 71.

62. MEYERING (C.A.), ISRAELS (A.L.M.), SEBENS (T.), HUISMAN (T.H.J.). — Studies on the heterogeneity of hemoglobin. II The heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in Amberlite IRC 50 chromatography = quantitative aspects. *Clin. chim. Acta.*, 1960, 5, 208.
63. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. biol. Chem.*, 1951, 192, 663.
64. MORETTI (J.), BOUSSIER (G.), JAYLE (M.F.). — Réalisation technique et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, 39, 593.
65. MORRISON (M.). — A new haemoprotein with a unique iron porphyrin prosthetic group isolated from human erythrocytes. *Nature*, 1961, 189, 765.
66. MORRISON (M.), CONNELLY (G.), STOTZ (E.). — Studies of hemins A₁ and A₂. *Biochim. biophys. Acta.*, 1958, 27, 214.
67. MORRISON (M.), COOK (J.I.). — Chromatographic fractionation of normal adult oxyhemoglobin. *Science*, 1955, 122, 920.
68. MORRISON (M.) et STOTZ (E.). — The extraction and paper chromatography of hemins. *J. biol. Chem.*, 1957, 228, 123.
69. MOTULSKY (A.G.). — Controller genes in synthesis of human hemoglobin. *Nature*, 1962, 194, 607.
70. MULLER (C.J.). — A comparative study on the structure of mammalian and avian haemoglobins. *Thesis Groningen 1961. Van Gorcumand Co. N.V. Assen Netherlands.*
71. NEEL (J.K.). — The hemoglobin genes = a remarkable example of the clustering of related genetic functions on a single mammalian chromosome. *Blood.*, 1961, 18, 769.
72. PAULING (L.), ITANO (H.A.), SINGER (S.J.), WELLS (I.C.). — Sick cell anemia a molecular disease. *Science*, 1949, 110, 543.
73. PETERSON (E.A.), SOBER (A.S.). — Variable gradient device for chromatography. *Analyt. Chemistry.*, 1959, 31, 857.
74. POTLIK (M.D.). — Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 1957, 180, 1977.
75. PRANKERD (T.A.J.). — The ageing of red cells. *J. Physiol.*, 1958, 143, 325.
76. PRINS (H.K.) et HUISMAN (T.H.J.). — Chromatographic Behaviour of Haemoglobin E. *Nature*, 1956, 177, 840.
77. RAMSEY (H.J.). — A comparative study of hemoglobin denaturation. *J. cell. comp. Physiol.*, 1941, 18, 369.
78. RANNEY (H.N.), KONO (P.). — Studies on the incorporation of ⁵⁹Fe into normal and abnormal hemoglobins. *J. clin. Invest.*, 1959, 38, 508.
79. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.), MOUTTE (M.). — Solubilité dans les solutions salines concentrées et caractères spécifiques des hémoglobines sanguines. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, 23, 1114.
80. ROSA (J.). — Contribution à l'étude de l'hémoglobine par l'électrophorèse sur amidon. *Thèse Doct. Médecine, Paris* 1958.
81. ROSA (J.), SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.). — Vieillesse moléculaire de l'hémoglobine de lapin pendant la vie du globule rouge. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1961, 43, 555.
82. SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.), KRUH (J.). — Métabolisme différent de deux hémoglobines chez un même animal adulte étudié à l'aide du fer radioactif. *C.R. Acad. Sci.*, 1950, 230, 161.
83. SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.), KRUH (J.). — Synthèse des hémoglobines humaines marquées *in vivo* (hommes normaux et atteints de leucémie aiguë) et *in vitro*. *C.R. Soc. Biol.*, 1953, 147, 780.
84. SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.), KRUH (J.). — Physiopathologie de l'hémoglobine et du globule rouge étudiée à l'aide du fer radioactif. *Sang*, 1953, 24, 142.

85. SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.), KRUH (J.). — Heterogeneous metabolism of haemoglobins in : Porphyrin biosynthesis and metabolism. *A Ciba foundation symposium*, Churchill ed. Londres 1955, 1966.
86. SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.), KRUH (J.). — Heterogeneity of hemoglobin and method of isotopic biosynthesis. Conf. on Hemoglobin. Washington may 1957. *Nat. Acad. Sci. publ.* 557, 1958, 201.
87. SCHAPIRA (G.), ROSA (J.). — Problèmes biochimiques posés par le vieillissement et la mort du globule rouge. *Ann. Biol. clin.*, 1962, 20, 307.
88. SCHNECK (A.G.), SCHROEDER (N.A.). — The relation between the minor components of whole normal adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. *J. amer. chem. Soc.*, 1961, 83, 1472.
89. SCHWEET (R.), LAMFROM (H.), ALLEN (E.). — The synthesis of hemoglobin in a cell-free system. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1958, 44, 1029.
90. SHEMIN (D.), RITTENBERG (D.). — The life span of the human red blood cell. *J. Biol. Chem.*, 1946, 166, 627.
91. SINGER (K.), CHERNOFF (A.I.), SINGER (I.). — Studies on abnormal hemoglobins : I Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood*, 1951, 6, 413.
92. SINGER (S.J.), ITANO (H.A.). — On the asymmetrical dissociation of human hemoglobin. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1959, 45, 174.
93. SMITHIES (O.). — Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 1955, 61, 629.
94. SMITHIES (O.). — An improved procedure for starch gel electrophoresis : further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.*, 1959, 74, 585.
95. SVEDBERG (T.), FARAEUS (R.). — A new method for the determination of the molecular weight of proteins. *J. amer. chem. Soc.*, 1926, 48, 430.
96. TOENNIES (G.), KOLB (J.J.). — Techniques and reagents for paper chromatography. *Ann. Chem.*, 1951, 23, 823.
97. VINOGRAD (J.), HUTCHINSON (W.D.). — Carbon 14 labeled hybrids of haemoglobin. *Nature*, 1960, 187, 216.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I. Travaux antérieurs	11
CHAPITRE II. Matériel et méthodes employées	15
CHAPITRE III. I) Mise au point d'une méthode de fractionnement chromatographique de l'hémoglobine de lapin.	
II) Activités spécifiques des fractions éluées.....	23
CHAPITRE IV. Critères de pureté de la fraction individualisée.....	31
CHAPITRE V. Étude comparée de la structure chimique des hémoglobines A ₁ et A ₂	39
CHAPITRE VI. Interprétation biologique	43
CHAPITRE VII. Étude de l'hétérogénéité métabolique de l'hémoglobine chez les lapins anémisés	49
CHAPITRE VIII. Fractionnements après synthèse d'hémoglobine <i>in vitro</i>	55
CHAPITRE IX. Hétérogénéité métabolique de l'hémoglobine humaine.	61
CHAPITRE X. Discussion	63
CONCLUSIONS	67

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

“ Les protéines fœtales ”

Vu et Approuvé :

Paris, le 20 mars 1964

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKI

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE

Achevé d'imprimer le 5 Mai 1964

Imprimerie E. LANORD - 22, rue Chauvelot, Paris-15^e

